

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**  
**DOUTORADO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**JOSÉ LUIZ FERREIRA DA TRINDADE**

**OBTENÇÃO DE GIBERELINAS PELA FERMENTAÇÃO DO  
ESTEVIOSÍDEO E DO 7 $\beta$ - HIDROXIESTEVIOL POR  
BIOTRANSFORMAÇÃO**

**CURITIBA**

**2004**

**JOSÉ LUIZ FERREIRA DA TRINDADE**

**OBTENÇÃO DE GIBERELINAS PELA FERMENTAÇÃO DO  
ESTEVIOSÍDEO E DO 7 $\beta$ - HIDROXIESTEVIOL POR  
BIOTRANSFORMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira.

**CURITIBA**

**2004**

T833 Trindade, José Luiz Ferreira da

Obtenção de giberelinas pela fermentação do esteviosídeo e do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol por biotransformação / José Luiz Ferreira da Trindade. - Curitiba, 2004.

82 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

1. Biotransformação. 2. *Gibberella fujikuroi*. 3. Giberelinas. 4. Esteviosídeo. 5. Esteviol. 6. 7 $\beta$ -hidroxiesteviol. I. Oliveira, Brás Heleno de. II. Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia. III. Título.

660.6

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

JOSÉ LUIZ FERREIRA DA TRINDADE

### **OBTENÇÃO DE GIBERELINAS PELA FERMENTAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E OBTENÇÃO DO 7 $\beta$ - HIDROXIESTEVIOL POR BIOTRANSFORMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, tendo a seguinte banca examinadora.

---

Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Orientador- Departamento de Química – UFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Rita Sierakowski  
Departamento de Química – UFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Porto de Souza Vandenberghe  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos – UFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana  
Departamento de Engenharia Química – UNICAMP

---

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho  
Departamento de Farmácia – UNIVALI

Curitiba, 10 de dezembro de 2004.

## RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

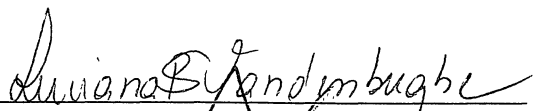
Aos dez dias do mês de dezembro de 2004 no Salão Nobre do Prédio da Administração do Setor de Tecnologia, Centro Politécnico, da universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Vigésima Quarta Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração Agroindústrias. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Maria Helena Andrade Santana (UNICAMP), Valdir Cechinel Filho (UNIVALE-UFSC), Maria Rita Sierakowski (UFPR), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR) e Brás Heleno de Oliveira (UFPR).

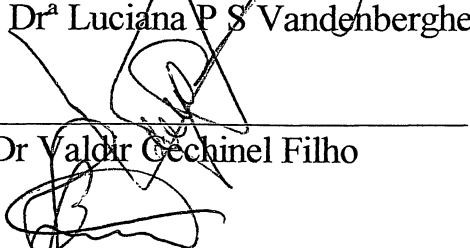
Às 13:30 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **José Luiz Ferreira da Trindade** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“Obtenção de Giberelinas pela Fermentação do Esteviosídeo e Obtenção do 7B- Hidroxiesteviol por Biotransformação”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

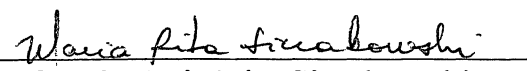
Tendo em vista a tese e a arguição, a banca atribuiu os seguintes conceitos: Profª Drª Luciana P S Vandenberghe A; Profª Drª. Maria Helena Andrade Santana A; Prof Dr. Valdir Cechinel Filho A; Profª. Drª. Maria Rita Sierakowski A; e Prof Dr. Brás Heleno de Oliveira A.  
A média obtida resultou na APROVAÇÃO do candidato, com conceito final A (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 10 de dezembro de 2004.

  
Profª Drª Luciana P S Vandenberghe

  
Profª Drª Maria Helena Andrade Santana

  
Prof Dr Valdir Cechinel Filho

  
Profª Drª Maria Rita Sierakowski

  
Prof Dr Brás Heleno de Oliveira

Aos meus colegas professores e alunos,  
motivos da minha decisão de seguir aprendendo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pela amizade, pela orientação tranquila, valiosa e paciência.

Aos meus colegas de curso, em especial ao Dr. Marcio Chimeli, ao Dr. Maurício Passos e ao Dr. Alessandro Nogueira, pelo companheirismo e mesmo pela ajuda em muitos experimentos.

Aos professores do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos que com dedicação contribuíram com a realização deste sonho.

Aos meus colegas, funcionários e professores do CEFET pelo estímulo, apoio em todos os momentos e que me permitiram chegar ao final desta caminhada, em especial aos colegas Prof. Ariel Orlei Michaloski, coordenador da COALI e Prof. Luis Alberto C. Ayala.

Aos meus colegas de doutorado, pela ajuda, compreensão, crítica e, sobretudo, pela amizade, que tornaram em grande parte este trabalho possível.

Aos meus alunos, que foram pacientes com minhas esquisitices nestes cinco últimos anos.

À minha família e meus amigos, pelo amor e carinho recebido nesses últimos cinco anos. Quantas coisas se passaram, quantos se foram nesse tempo e os lembro agora com saudade. Dedico a todos vocês esse trabalho, em agradecimento, amizade, confiança e tolerância.

A Adalziza, Analice, Naomi (Lucas) e Mario, ao concluir este trabalho, digo, muito obrigado. Este doutorado só foi concluído pela extrema colaboração, amor e orações que vocês me dirigiram. Agradeço a Deus, pela certeza de que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis.



## RESUMO

O desenvolvimento da agroindústria brasileira tem sido sustentado por uma busca incessante da pesquisa na área de produção vegetal, visando torná-la ainda mais competitiva, aumentando a produtividade com produtos agrícolas de qualidade e com alto valor econômico. A pesquisa de reguladores do crescimento vegetal, como as giberelinas, cumpre esta finalidade. Entretanto, esses compostos são de alto custo em função de serem obtidos por processos de fermentação. Novos processos, por outro lado, são necessários com o objetivo de reduzir esses custos e um grande número de pesquisas vem sendo realizadas para encontrar novos processos de produção, isolamento e caracterização destes compostos. O fungo *Gibberella fujikuroi* é o mais comumente usado para a produção da mais importante giberelina comercial, o ácido giberélico, por fermentação submersa. O uso de precursores é uma das estratégias para aumentar o rendimento no processo de fermentação. A biotransformação de diterpenos tetracíclicos com o esqueleto caureno, por fungos como a *Gibberella fujikuroi*, leva a produção de giberelinas. O esteviosídeo e sua aglicona o esteviol poderiam ser usados em biotransformação microbiana para a produção de ácido giberélico, por terem em suas rotas metabólicas o ácido caurenóico. Esta pesquisa teve por foco avaliar as condições para a biotransformação do esteviosídeo na produção de ácido giberélico. Para tanto, fez-se necessário identificar cepas de *G. fujikuroi* capazes de realizar essa biossíntese. Identificadas duas cepas de *G. fujikuroi*, denominadas  $s_1$  e  $s_2$ , buscou-se a determinação da condição de cultivo dessas, com melhores rendimentos entre pH 3 e 4. Variando as concentrações de esteviosídeo no meio de fermentação, não houve acréscimo significativo na produção de  $GA_3$ . Na preparação de inóculo das cepas de *G. fujikuroi*,  $s_1$  e  $s_2$ , a substituição da glucose por esteviosídeo no meio de cultura promoveu alteração positiva da resposta do fungo na biotransformação. As condições para obtenção do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol também foram estudadas. Com este composto, após isolamento, purificação e caracterização por RMN, elaboraram-se ensaios para testar sua atividade biológica, tendo como controle o ácido giberélico. Com o bioensaio do hipocótilo, o composto mostrou pequena atividade fitohormonal, comparado ao  $GA_3$ . Nesse mesmo teste, o esteviol não apresentou nenhuma atividade fitohormonal. No teste da aleurona na cevada, entretanto, o 7 $\beta$ -hidroxiesteviol apresentou atividade biológica superior ao controle. Isso tem indicado, portanto, a possibilidade de uso do esteviosídeo como precursor na produção do ácido giberélico. Adicionalmente, o 7 $\beta$ -hidroxiesteviol pode ser obtido via biotransformação e tem uma bioatividade comparável ao ácido giberélico na estimulação da produção da amilase em sementes.

**Palavras-chave:** Biotransformação. *Gibberella fujikuroi*. Giberelinas. Esteviol. Esteviosídeo. 7 $\beta$ -hidroxiesteviol.

## ABSTRACT

The development of the Brazilian agroindustry has been supported by research in the area of plant production in order to make it more competitive, increasing the productivity of qualities agricultural products and high economical value. The research of plant growth regulators as the gibberellins can help to reach this objective. However, these compounds are expensive because they are obtained by fermentation processes. New processes are therefore needed in order to reduce these costs and many researchers have been carried out to find new process of production, isolation and characterization of these compounds. The fungus *Gibberella fujikuroi* is the most commonly used for the production of gibberellic acid, the commercially most important gibberellin, by submerses fermentation. The biotransformation of steviol by fungi, as *G. fujikuroi*, leads to the production of gibberellins. Stevioside, a natural glicoside which has steviol as the aglicone, could therefore be used as a precursor for the production of gibberellins. This work had the objective to study the conditions for the conversion of stevioside for the production of gibberellic acid. A few strains of *G. fujikuroi* were tested and two of them, named  $s_1$  and  $s_2$ , were chosen for further studies. The results showed that between pH 3 e 4 yields were higher for the production of GA<sub>3</sub>. Varying the concentration of stevioside in the fermentation medium, however, did not led to a significant variation in yields. When the conditions for inoculum preparations were studied, exchanging stevioside for glucose, there was a positive response increasing yields. After isolation, purification and characterization the product was assayed for its plant growth regulator properties, in comparison with gibberellic acid. It has been demonstrated, therefore, that it is possible to use stevioside as a precursor in the gibberellic acid production. Furthermore, the 7 $\beta$ -hidroxy derivative of steviol can be obtained by biotransformation and has a bioactivity comparable to that of gibberellic acid in the stimulation of amylase production in seeds.

**Keywords:** Biotransformation. *Gibberella fujikuroi*. Gibberellins. Steviol. Stevioside. 7 $\beta$ - hidroxisteviol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas representativas dos cinco principais fitohormônios.....	15
Figura 2 - Estrutura do ent-giberelano (à esquerda) e do 20-nor ent-giberelano (à direita) que originam classes de giberelinas .....	20
Figura 3 - Rota biossintética do ácido giberélico em <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	21
Figura 4 - Estrutura do esteviol e seus glicosídeos .....	29
Figura 5 - Modelo de hidrólise de retiradas sequenciais das glucoses do carbono 13 em quatro intermediários possíveis.....	30
Figura 6 - Representação gráfica do cromatograma da seleção das cepas .....	47
Figura 7 - Biomassa produzida pelos fungos avaliados (n = 1).....	48
Figura 8 - Curva de calibração para o GA <sub>3</sub> .....	50
Figura 9 - Produção de GA <sub>3</sub> com inóculo preparado com e sem glucose (n = 3).....	51
Figura 10 - Quantificação de GA <sub>3</sub> por CLAE, comparando o preparo de amostras em colunas de adsorção, com fase estacionária em sílica C18 e PC18 (n = 3).....	52
Figura 11 - Produção de GA <sub>3</sub> pela <i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub> em diferentes pHs (n = 3).....	53
Figura 12 - Produção do GA <sub>3</sub> pela <i>Gibberella Fujikuroi</i> s <sub>2</sub> em função do pH (n = 3) .	54
Figura 13 - Biomassa produzida na biotransformação entre a <i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub> e <i>G. fujikuroi</i> s <sub>2</sub> em função do pH (n = 3) .....	55
Figura 14 - Biomassa produzida na fermentação em pH 3,0; 4,0 e 5,0 (n = 3) .....	56
Figura 15 - Produção de GA <sub>3</sub> pela <i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub> em pH 4,0 a partir do esteviosídeo (n = 3).....	57
Figura 16 - Efeito da composição do inóculo na produção de GA <sub>3</sub> por fermentação com o esteviosídeo como precursor (n = 3) .....	58
Figura 17 - Influência do preparo de inóculo e concentrações de esteviosídeo na produção de GA <sub>3</sub> (n = 3) .....	59
Figura 18 - Biotransformação do esteviosídeo em várias condições de preparo de inóculo e meio de cultura (n = 3) .....	61
Figura 19 - Cinética da produção do GA <sub>3</sub> e biomassa formadas a partir do esteviosídeo (n = 3).....	62
Figura 20 - Cromatograma da cinética da biotransformação do esteviosídeo com produção de GA <sub>3</sub> (n = 3) .....	63
Figura 21 - Análise qualitativa em CCD do 7β-hidroxiesteviol obtido por biotransformação do esteviol (n = 1) .....	65
Figura 22 - Isolamento do 7β-hidroxiesteviol por cromatografia em camada delgada centrífuga.....	66
Figura 23 - Formação do composto 7β-hidroxiesteviol por biotransformação do esteviol em função do tempo de incubação .....	67

Figura 24 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol nas concentrações de 0,01 a 20 mg ml <sup>-1</sup> frente ao padrão GA <sub>3</sub> (n =3).....	68
Figura 25 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol frente ao padrão GA <sub>3</sub> (n = 3).....	69
Figura 26 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, frente o GA <sub>3</sub> , e o esteviol (n = 3).....	70
Figura 27 - Teste da aleurona da cevada, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, frente o GA <sub>3</sub> , e o esteviol (n = 3) .....	72
Quadro 1 - Microrganismos produtores de giberelinas.....	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento do experimento com diferentes preparações de inóculo e meio de biotransformação .....	39
Tabela 2 - Tipo de ensaio e condições de inóculo e meios de biotransformação .....	42
Tabela 3 - Seleção dos fungos produtores de GA <sub>3</sub> e/ou ga <sub>4,7</sub> (n = 1) .....	47
Tabela 4 - Avaliação das cepas de <i>gibberella fujikuroi</i> s <sub>1</sub> e s <sub>2</sub> com relação a ph, biomassa e produção de GA <sub>3</sub> em diferentes concentrações de esteviosídeo (n= 3).....	49
Tabela 5 - Produção de GA <sub>3</sub> em relação com a biomassa produzida nos diferentes pHs (n = 3).....	55

## LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido indol-acético
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCDC	Cromatografia de camada delgada centrífuga
CDP	Difosfato de copalila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPP	Pirofosfato de copalila
cps	Pirofosfato de copalila sintase
DNS	Dinitro salicilato de sódio
EFS	Extração em fase sólida
FDP	Difosfato de farnesila
FPP	Pirofosfato de farnesila
GAs	Giberelinas
GDP	Difosfato de geranila
GGDP	Difosfato de geranil-geranila
GTase	Glucosil transferase
HMG-CoA	Hidróxi-3-metil-glutaril coenzina A
ICI	<i>Imperial Chemical Industries</i>
IPP	Difosfato de isopentenila
Ks	caureno sintase
MSM	Meio Sabouraud Modificado
MVA	Ácido mevalônico
Nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
PM	Peso molecular
Rf	Razão de frente
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta
Vvm	Volume-volume por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL: ÊNFASE NAS GIBERELINAS .....	15
2.2 HISTÓRICO DAS GIBERELINAS.....	19
2.3 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DAS GIBERELINAS.....	20
2.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO DE GIBERELINAS.....	22
2.5 PRODUÇÃO DE GIBERELINAS .....	24
2.6 ESTEVIOL COMO PRECURSOR DO ÁCIDO GIBERÉLICO PELO METABOLISMO DA <i>G. FUJIKUROI</i> .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	31
3.2 MICRORGANISMOS .....	32
3.2.1 Fungos.....	32
3.2.2 Preservação das Culturas.....	33
3.2.3 Reativação das Culturas.....	33
3.3 CONVERSÃO DO ESTEVIOSÍDEO EM GIBERELINAS .....	34
3.3.1 Meios de Cultura para a Seleção dos Microrganismos.....	34
3.3.2 Adição do Esteviosídeo ao Meio Fermentativo .....	34
3.3.3 Análise Qualitativa do Ácido Giberélico .....	35
3.3.4 Elaboração da Curva Padrão para Quantificação do GA <sub>3</sub> .....	35
3.3.5 Experimentos em Escala Analítica.....	35
3.3.6 Determinação da Biomassa .....	36
3.3.7 Otimização da Limpeza da Amostra .....	36
3.3.8 Otimização da Limpeza da Amostra Comparando a Sílica C-18 e PC-18 .....	37
3.3.9 Biotransformação do Esteviosídeo nas Concentrações de 1, 2 e 3 mg mL <sup>-1</sup> .....	37
3.3.10 Biotransformação do Esteviosídeo para Ácido Giberélico em Escala Preparativa .....	38
3.3.11 Comparação de Inóculo Preparado com Glucose e com Esteviosídeo .....	38
3.3.12 Avaliação da Biotransformação do Esteviosídeo em Diferentes pHs .....	39
3.3.13 Experimento com o Esteviosídeo como Única Fonte de Carbono .....	40
3.3.14 Obtenção das Cepas de <i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub> <sup>2</sup> e s <sub>2</sub> <sup>2</sup> .....	40
3.3.15 Produção de GA <sub>3</sub> em Diferentes Condições de Inóculo e Meio de Cultura.....	41
3.3.16 Cinética da Produção do GA <sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo .....	42
3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL EM GIBERELINAS .....	43

3.4.1 Obtenção do Esteviol.....	43
3.4.2 Biotransformação do Esteviol em 7 $\beta$ -hidroxiesteviol.....	43
3.4.3 Isolamento e Purificação do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol.....	44
3.4.4 Preparação do Diazometano .....	44
3.4.5 Esterificação do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol com Diazometano.....	45
3.4.6 Teste do Hipocótilo .....	45
3.4.7 Bioensaio de Aleurona de Cevada.....	45
3.4.8 Carboidratos Redutores – Método DNS .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
4.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO COM PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO .....	47
4.1.1 Seleção dos Fungos Possíveis Produtores de GA <sub>3</sub> .....	47
4.1.2 Efeito da Composição do Inóculo Sobre a Produção de GA <sub>3</sub> .....	50
4.1.3 Preparação de Amostras com Giberelinas Utilizando Sílica C-18 e PC-18 ....	52
4.1.4 Produção de GA <sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo em Diferentes pHs.....	53
4.1.5 Produção de GA <sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo nos pHs 3,0; 4,0 e 5,0.....	55
4.1.6 Produção do GA <sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo com a <i>Gibberella fujikuroi</i> s <sub>1</sub> .....	57
4.1.7 Influência do Preparo do Inóculo na Produção de GA <sub>3</sub> .....	58
4.1.8 Produção de GA <sub>3</sub> com a <i>G. fujikuroi</i> s <sub>2</sub> e s <sub>2</sub> <sup>2</sup> em Diferentes Condições de Inóculo e Meio de Produção.....	60
4.1.9 Cinética da Produção do GA <sub>3</sub> com a <i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub> em pH 5,0 e Adição de 2,0 mg.mL <sup>-1</sup> de Esteviosídeo.....	61
4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL PARA A PRODUÇÃO 7 $\beta$ - HIDROXIESTEVIOL.....	64
4.2.1 Obtenção do Esteviol.....	64
4.2.2 Produção do 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol Através de Biotransformação .....	64
4.2.3 Isolamento, Purificação e Comprovação da Estrutura do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol .....	65
4.2.4 Bioensaio Comparando o Efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol Frente ao GA <sub>3</sub> .....	67
4.2.5 Bioensaio Comparando o Efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol Frente ao Esteviol.....	70
4.2.6 Bioensaio de Aleurona de Cevada.....	71
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6 PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As giberelinas (GAs) pertencem a uma grande família, relatada como ácidos diterpenóides, com atividade fitohormonal (TUSDZYNSKI, 1999; KUMAR; LONSANE, 1988), usadas na agricultura para antecipar o florescimento e realizar a quebra de dormência de sementes (GRAEB, 1987), padronizar a germinação de cevada nas maltearias (BRIGGS, 1998), melhorar as características do fruto na citricultura e contribuir para a resistência da casca na colheita mecânica (MODESTO, RODRIGUES; PINHO, 1999). Na viticultura, essas substâncias conseguem uniformizar o tamanho e quantidade de bagas, melhorando suas características fitossanitárias e comerciais. (CATO, 2002; CHRISTOD *et al.*, 1968). Árvores frutíferas, quando tratadas com ácido giberélico, conseguem acelerar seu ciclo fisiológico, aumentando as produções e disponibilizando colheitas antecipadas, com consequente aumento do valor comercial do produto.

O valor comercial dos *kits* contendo ácido giberélico para os mais diversos usos em agricultura está na ordem de U\$ 10,00/grama (HUDSON, 2004).

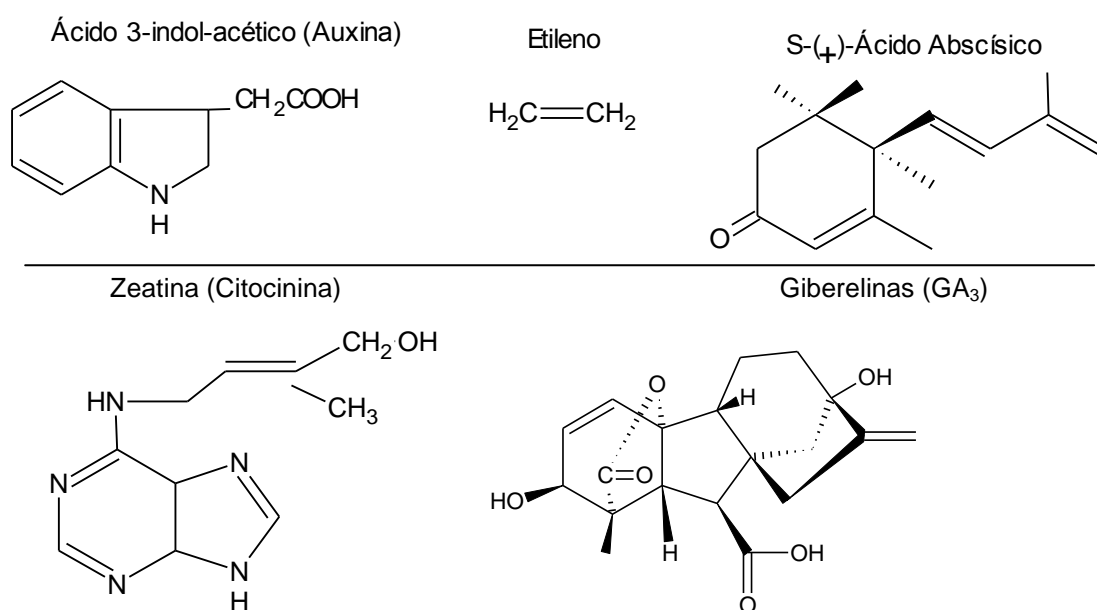
Descobertas inicialmente pela atividade da *Gibberella fujikuroi*, produzindo o GA<sub>3</sub>, outras GAs foram identificadas e produzidas comercialmente (HEDDEN, 2002). Em seguida, vários trabalhos foram conduzidos determinando as condições de fermentação para a produção das giberelinas (SURULIRAJAN; SARBHOY, 2000; STODOLA *et al.*, 1955), envolvendo estudo do metabolismo (Mac MILLAN, 1984), extração (HOLLMANN *et al.*, 1995) e métodos de análise cromatográfica (PEARCE; KOSHIOKA; PHARIS, 1994).

O presente trabalho teve como objetivo melhorar os rendimentos de GA<sub>3</sub>, obtidos na fermentação líquida, pela adição de esteviosídeo ao meio de cultivo ou como exclusiva fonte de carbono, estudando condições de pH e concentrações de esteviosídeo no meio de fermentação. Foram estudadas ainda as condições de formação do composto intermediário da biotransformação do esteviosídeo até ácido giberélico, o 7β-hidroxiesteviol, bem como sua atividade biológica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL: ÊNFASE NAS GIBERELINAS

O crescimento de plantas é baseado na produção de células nos meristemas, seguida de alongação destas novas células formadas. Os reguladores de crescimento vegetal apresentam a função de influir na maioria dos aspectos de crescimento, desenvolvimento celular e diferenciação de tecidos e órgãos de plantas. Os cinco principais reguladores, cujas estruturas estão representadas na Figura 1, são: auxinas (IAA), citocininas, gás etileno, ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GAs). (KENDE; ZEEVAART, 1997).



**Figura 1 - Estruturas representativas dos cinco principais fitohormônios**  
**Fonte: Kende; Zeevaart (1997)**

Uma grande quantidade de compostos, incluindo hormônios, tem sua presença em órgãos da planta determinada pela combinação de taxas de biossíntese e catabolismo enzimático, abundante nos processos de desenvolvimento das plantas. Os hormônios vegetais estão presentes em quantidades muito pequenas nas plantas.

Uma doença chamada como *Bakanae-byo* em japonês, foi primeiramente descrita em plantas orientais por Hori, em 1898 e era provocada pelo fungo

*Fusarium moniliforme* que, em seu estágio sexuado, é chamado de *Gibberella fujikuroi*. Essa doença era mais comum em plantas de arroz (STODOLA *et al.*, 1955).

As giberelinas pertencem a um importante grupo de hormônios de crescimento de plantas, envolvidos no controle de diferentes processos fisiológicos como: regulação da brotação de muitas culturas comerciais, regulação da floração em algumas plantas bienais ou plantas fotoperiódicas, frutíferas, maturação e desenvolvimento de frutas (CASTILLO *et al.*, 1997, KENDE; ZEEVAART, 1997).

A atividade das giberelinas como hormônios naturais das plantas acontece por meio do controle dos processos de desenvolvimento, como a indução da atividade de hidrólise enzimática durante a germinação, o alongamento do caule, a indução do florescimento, a produção de sementes e o desenvolvimento do pericarpo (GRAEB, 1987).

A aplicação de giberelinas em uma parte da planta provocará um efeito regulatório em toda a planta, mostrando uma translocação completamente sistêmica, em contraste com a ação das auxinas, as quais são carregadas de forma direcionada a regiões restritas de influência regulatória (CARL; KRIEDMANN, 1975).

As videiras desenvolvidas em regiões tropicais caracterizam-se por apresentar um crescimento contínuo, sem amarelecimento ou queda natural das folhas. Há uma marcante dominância apical nas varas deixadas pela poda e, além disso, uma tendência à produção de cachos muito compactos, em consequência das temperaturas elevadas e da baixa umidade relativa do ar que favorecem a fecundação das flores. Essas características naturais do desenvolvimento das videiras podem ser modificadas pela utilização de substâncias orgânicas biorreguladoras como o ácido giberélico (ALBUQUERQUE; DANTAS, 2004).

O efeito na frutificação da uva sem sementes, variedade Maria, também foi estudado (BARBOSA, 1998). Avaliaram-se também os efeitos nas características dos cachos de uva de mesa cultivar Rubi, na região da nova Alta Paulista (BOTELHO *et al.*, 2002).

Em uvas, a aplicação de GA<sub>8</sub> às flores depois da queda das pétalas aumenta fortemente o tamanho das bagas, enquanto que, na uva para vinho, 1 a 10 µg.ml<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> podem mudar a forma do cacho, tornando as bagas mais frouxamente arranjadas. Isso apresenta a vantagem de que as bagas não são amassadas durante o crescimento e secam rapidamente após a chuva, reduzindo

assim as perdas devidas a fungos e bactérias, que podem causar apodrecimento de uma porcentagem considerável das frutas (CHRISTOD *et al.*, 1968).

Suas aplicações na maltagem, horticultura e agricultura são amplamente difundidas. A adição de GA<sub>3</sub> reduz o tempo de germinação e uniformiza o comprimento das radículas, incrementando a qualidade do malte. O uso do GA<sub>3</sub> na produção em escala comercial de alcachofra, aipo, pepino, alface, espinafre, cerejas, videiras, limões, laranjas e pêras, entre outras, é fundamental para se alcançar uniformidade de produção. Árvores frutíferas usualmente tratadas com ácido giberélico conseguem acelerar seu ciclo fisiológico, aumentando as produções e disponibilizando colheitas antecipadas, aumentando o valor comercial do produto.

A utilização do GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> na implantação de pomares de maçã acelera o desenvolvimento das plantas, disponibilizando colheitas mais precoces e frutos com formatos mais apreciáveis (JEFERYS, 1970).

Experiências em pesquisa e desenvolvimento feitos em Cuba têm mostrado os benefícios dos microrganismos inoculantes, a partir de *Azospirillum inocula* e *Azotobacter* sp. sobre o aumento das colheitas agrícolas, especialmente na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e de fitohormônios, como o ácido indol acético (IAA) produzidos por *Rhizobium* sp. O ácido jasmônico foi produzido pelo *Botryodiplodia theobromae* e o ácido giberélico usando *G. fujikuroi* (KLIBANSKY-DELGADO; GONZALES-PENICHET, 1996).

A variedade de videira *Thompson seedless* requer a aplicação de ácido giberélico, pós-floração, para uma adequada formação das bagas e adequação às exigências do mercado consumidor. Leão (2004) bem como Perez e Gomez (1998) estudaram que concentrações de GA<sub>3</sub> poderiam ser aplicadas de forma a evitar um dano conhecido como engrossamento do pedicelo das bagas, que pode levar à sua queda. Esse engrossamento do elo entre a baga e a raquis, pedicelo, faz com que se perca a elasticidade pela rigidez adquirida, fazendo com que quebre esta ligação com qualquer pequena pressão, derrubando-a.

O ácido giberélico foi utilizado em laranjais da variedade Valência (*Citrus sinensis*) com o objetivo de se avaliar as mudanças nas propriedades mecânicas da casca da laranja. Observou-se que, na segunda colheita após a aplicação, as cascas apresentaram 10% maior resistência ao corte e à ruptura quando submetidas à tensão, comparadas às plantas similares não tratadas (FIDELIBUS; TEIXEIRA;

DAVIES, 2002). A influência da aplicação pré-colheita de ácido giberélico em tangerineira “PONKAN”, foi avaliada por Modesto *et al.* (1999).

Ferreira, Erig e Moro (2002) estudaram o efeito do GA<sub>3</sub> e GA<sub>4+7</sub> associados a fenilmetil-aminopurina, no crescimento e desenvolvimento da porta-enxerto *Annona squamosa* L. Utilizando diferentes concentrações, observou-se que houve efeito positivo no crescimento e volume de massa seca da parte área.

Além das giberelinas, outros constituintes naturais de plantas tem apresentado atividade na forma de estimulação do crescimento. O ácido caurenóico tem sido reportado como um composto natural com atividade em ensaio com arroz, da mesma forma como o esteviol. Isso é altamente provável dado que estes compostos mostram atividade como resultado da conversão, no interior das plantas para um tipo de giberelina (CARL; KRIEDMANN, 1975).

Alguns efeitos fenotípicos produzidos em plantas por ação de luz são muito semelhantes àqueles induzidos por hormônios. O crescimento de ramos, em plantas verdes, é afetado por diversas características das irradiações de luz. Luzes de baixa intensidade aumentam a elongação de ramos e ativam o conteúdo de ácido giberélico em ervilha e *Brassica*. Controles de fotoperíodo e fitocromos ativam níveis de GAs em dias longos em espinafre e em plantas lenhosas como o *Salix*, pela regulação de diferentes etapas de biossíntese e catabolismo do ácido giberélico (GARCIA-MARTINEZ; GIL, 2002).

Tachibana, Uemara e Sumimoto (1989) relataram a produção de um grande número de giberelinas, pela conversão de caurenos isolados de folhas de *Cryptomeria japonica*.

Na germinação de sementes de cevada, a produção de  $\alpha$ -amilase na camada de aleurona é desencadeada por giberelinas presentes no embrião. A formação de pequenas quantidades de enzimas a seguir é provavelmente “giberelina-dependente”. A liberação de giberelina no endosperma começa quando o teor de açúcar contido no embrião está sendo reduzido pelo período inicial do metabolismo, desencadeado pela absorção de água. Então, o nível de giberelina produzida declina quando os níveis de açúcares no embrião são restaurados pela chegada de mais açúcares, provindos do endosperma, hidrolisados pela ação catalítica das enzimas sobre o amido e paredes celulares (SMITH; BRIGGS, 1979).

A degradação do amido nas células está intimamente associada com a germinação de cereais, a fotossíntese nas folhas, o armazenamento de carboidratos

nas raízes tuberosas e o desenvolvimento de polpa das frutas (WANG; ZANG, 2002), processos desencadeados pela ação dos fitoreguladores como as auxinas e ácido giberélico.

Ross *et al.* (2002) discutiram a interação entre auxina promovendo a biossíntese de ácido giberélico em hastes decapitadas de ervilha (*Pisum sativum* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Avaliaram a inter-relação entre a ação da auxina e os mecanismos bioativos das GAs, especialmente da GA<sub>1</sub>, seus níveis de regulação e a implicação desta relação, para o controle do crescimento das plantas.

Folhas cortadas de *Zantedeschia aethiopica* foram tratadas com soluções aquosas de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) tiveram sua vida útil, pós-colheita, consideravelmente extendidas, retardando a senescência, evitando a queda do nível de clorofila nesta folhagem. Outras características estão associadas com a senescência, como o teor de seiva nas células, o aumento do pH e a condutividade elétrica, parâmetros que podem ser rapidamente medidos, determinando o estado de senescência de flores cortadas durante a comercialização (SKUTNIK *et al.*, 2000).

## 2.2 HISTÓRICO DAS GIBERELINAS

Kurosawa em 1926, estudando doenças em plantas de arroz, causadas pelo fungo *G. fujikuroi*, observou o crescimento excessivo das plantas infectadas. Utilizando extrato destes tecidos e aplicando em partes não infectadas, provocava idêntico crescimento das plantas. A obtenção deste regulador de crescimento, somente foi obtida purificada e cristalizada por YABUTA em 1935, que lhe atribuiu o nome de giberelina (CARL; KRIEDMANN, 1975).

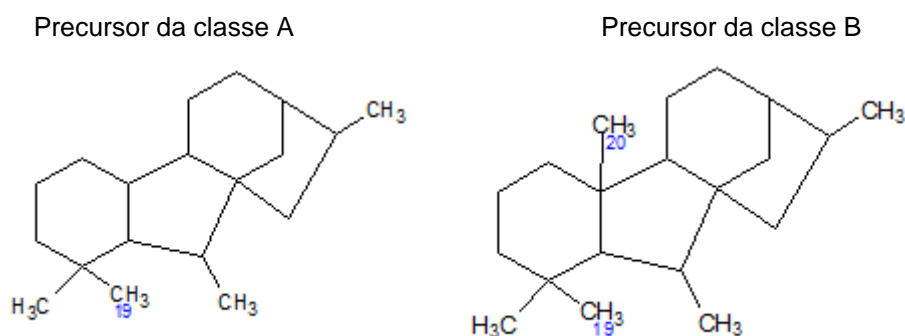
Desde a primeira descoberta, acham-se descritas acima de 120 diferentes giberelinas (GA<sub>121</sub>). As GAs mais importantes são do grupo GA<sub>3</sub>, também chamadas de ácido giberélico. As plantas verdes produzem somente umas poucas GAs (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>5</sub>), sendo a maioria das restantes produzidas por fungos e bactérias. Outras GAs também ativas são produzidas por outros fungos, exemplo, a GA<sub>4</sub> do *Sphaceloma manihoticola*. Os fungos *Neurospora crassa*, *Phaesosphaeria* sp. L. 487 produzem também GAs comercialmente pouco conhecidas (TUDZINKI, 1999).

O ácido giberélico passou a ser usado pela maioria dos viticultores no final da década de 80, para melhorar o aspecto do cacho (TERRA, 2003; CATO, 2002).

Esta ampla utilização das GAs tem promovido estudos a respeito de sua biossíntese (Mac MILLAN, 1997). A fonte comercial das GAs, bioativas, particularmente o GA<sub>3</sub>, dá-se pela fermentação do fungo, *G. fujikuroi*, a partir do qual as GAs foram originalmente descobertas. Até o momento presente, a produção mundial de GA<sub>3</sub> excede a 25 t por ano, com um valor de mercado de U\$ 100 milhões (TUDZYNSKI, 1999).

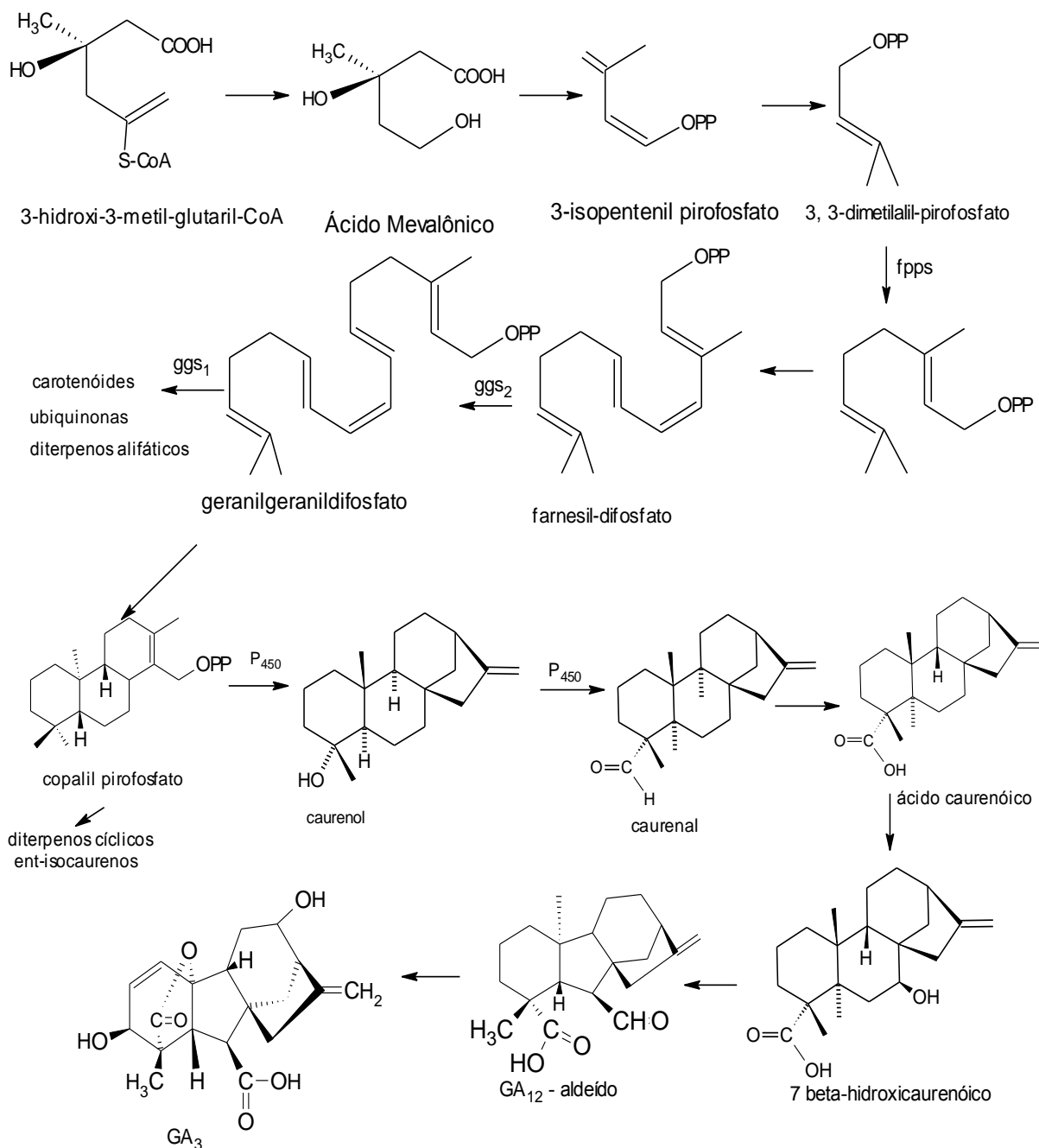
## 2.3 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DAS GIBERELINAS

As GAs pertencem a um grupo de diterpenóides tetracíclicos (esqueleto *ent*-giberelano), presentes em baixas concentrações nas plantas, onde regulam diferentes etapas do crescimento e desenvolvimento, constituindo uma família de compostos naturais (Figura 2). São identificadas pelos números subscritos GA<sub>n</sub>, onde n corresponde, aproximadamente, à ordem em que foram descobertas (RICHMANN *et al.*, 1999).



**Figura 2 - Estrutura do ent-giberelano (à esquerda) e do 20-nor ent-giberelano (à direita) que originam classes de giberelinas**  
**Fonte: Richmann *et al.* (1999)**

O primeiro passo da biossíntese das GAs, corresponde às duas etapas de ciclização do geranil-geranil pirofosfato a *ent*-caureno tendo o *ent*-copalil difosfato (pirofosfato) como intermediário, provável fator limitante, da velocidade de síntese, tanto de vegetais superiores quanto em fungos. O altamente hidrofóbico *ent*-caureno é então oxidado por um ou mais citocromos P 450 monooxigenases para ácido *ent*-kaurenoico via *ent*-kaurenol e *ent*-kaurenal (Figura 3).



**Figura 3 - Rota biossintética do ácido giberélico em *Gibberella fujikuroi***  
**Fonte: Tudzynski (1999)**

As enzimas P 450, responsáveis pela transformação do *ent*-caurano para aldeído giberélico (GA<sub>12</sub>) são monooxigenases, localizadas provavelmente no retículo endoplasmático. A sequência de oxidação do C-19, do *ent*-caurano via *ent*-caurenol e *ent*-caurenal para o ácido caurenóico é provavelmente catalisada por uma única enzima. A contração do anel B, com extrusão do C-7, fornece o aldeído giberélico (GA<sub>12</sub>).



Interessante ressaltar que o esteviol, aglicona do esteviosídeo, é um derivado hidroxilado do ácido caurenóico. Além disso, o metabolismo deste GA<sub>12</sub> varia entre espécies ou órgãos da mesma espécie com respeito à posição e sequência dos passos oxidativos. As maiores variações entre as diversas GAs dizem respeito à presença ou ausência de ligação insaturada no anel A, do número e posição dos grupos hidroxil e do número de grupos hidroxila. As giberelinas GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub> são algumas dentre muitas presentes em plantas e com possibilidade de muitas interconversões entre elas (CASTELLARO *et al.*, 1990).

## 2.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS NA PRODUÇÃO DE GIBERELINAS

O processo de fermentação pode ter como foco, quatro grandes grupos de interesse, são eles: produção de células microbianas (biomassa) como produto; produção de enzimas microbianas; produção de metabólitos microbianos e por último, os processos de transformação – objetivo, modificar um composto adicionado ao meio (STANBURY; WHITAKER, 1984).

As capacidades bioquímicas dos microrganismos são imensas. Microrganismos isolados podem produzir uma ampla variedade de compostos novos e pouco comuns. A modificação química de substâncias microbianas conhecidas e a biotransformação, que origina mudanças em uma molécula química devido a uma reação enzimática ou microbiana, são os procedimentos mais usuais na obtenção de novos metabólitos (CASTILLO *et al.*, 1999; CRUEGER; CRUEGER, 1993).

Em biotecnologia, a biocatálise representa a observação laboratorial sobre um microorganismo ou sobre a atividade de uma enzima isolada, com potencial para a utilização em desenvolvimento de um produto. Apresenta ainda várias vantagens, como: inúmeras conversões enzimáticas numa única etapa de processamento; especificidade estrutural e estereoquímica, condições brandas de temperatura, pressão e pH, alta eficiência de conversão quando otimizadas, novas rotas para novas moléculas, uso de recursos naturais renováveis, baixos riscos ambientais e à saúde humana (PROKOP, 1995).

A biocatálise efetua a química da vida, controlando transformações químicas no metabolismo primário e gerando produtos naturais em metabolismo secundário de plantas e microrganismos (WALSH, 2001).

As propriedades fisiológicas dos fungos permitem usá-los com propósitos de produção. Sob condições especiais, principalmente dependendo do suprimento de nutrientes, os fungos podem produzir uma ampla variedade de complexos compostos orgânicos, como, proteínas, antibióticos, álcoois, enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, drogas, pigmentos e gorduras (MEINHARDT; ESSER, 1993).

Vários grupos de microrganismos foram classificados como produtores de giberelinas (Quadro 1).

<b>Fungos filamentosos</b>	
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>G. lateritium</i>
<i>Boletus elegans</i>	<i>G. zeae</i>
<i>Botryodiploidea theobromae</i>	<i>Geophito fusicularis</i>
<i>Choetomium</i> sp.	<i>Geopetalum geogenium</i>
<i>Clitocybe dicolor</i>	<i>Crifola freudosa</i>
<i>Clitopilus pinsitus</i>	<i>Hypholoma fasciculase</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Lisea fujikuroi</i>
<i>Collybia conigena</i>	<i>Nectria galligena</i>
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>F. cucurbitae</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>F. culmonum</i>	<i>Phallus impudicus</i>
<i>F. herbanum</i>	<i>Phellinus pomaceous</i>
<i>F. heterosporum</i>	<i>Mizoetonia solani</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>F. moniliforme</i> var. <i>anthophillum</i>	<i>Sphaceloma manihoticola</i>
<i>F. maniliforme</i> var. <i>Majus</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>F. moniliforme</i> var. <i>Subglutinans</i>	<i>V. lateritium</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>V. nigrescens</i>
<i>F. solani</i>	<i>V. dahliae</i>
<b>Bactérias</b>	
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>B. megaterium</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>B. pumilis</i>
<i>A. radiobacter</i>	<i>B. polymyxa</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Brevibacterium</i> sp.
<i>Arthobacter</i> sp.	<i>Flavobacterium</i> sp.
<i>Arthobacter globiformis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>P. liquefaciens</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>P. desmolytica</i>
<i>B. cerpus</i>	<i>P. aeruginosa</i>

Actinomicetos	
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.
Leveduras	
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Torulopsis</i> sp.
<i>Torula pulcherrima</i>	

**Quadro 1 - Microorganismos produtores de giberelinas**

**Fonte: Kumar; Lonsane (1989)**

As giberelinas produzidas a partir de fungos fazem parte de uma extensa família de outros compostos encontrados em plantas superiores. Os estudos destas fermentações têm mostrado uma ampla quantidade de compostos que estão claramente implicados com a biossíntese e decomposição das giberelinas (JEFFERYS, 1970).

Alguns fungos utilizados neste trabalho são endofíticos. Fungos endofíticos ocupam um nicho ecológico e exercem uma grande influência na distribuição, ecologia, fisiologia e bioquímica das plantas. São aqueles fungos que vivem no interior das plantas e habitam, normalmente, as partes aéreas tais como folhas e caules sem causar qualquer doença para a planta (PIMENTEL, 2001).

## 2.5 PRODUÇÃO DE GIBERELINAS

A produção comercial de giberelinas com o fungo *Gibberella fujikuroi* é provavelmente um dos mais estudados e documentados processos industriais. Na sua produção, surgem inúmeros outros metabólitos secundários, iniciados quando se consome todo o nitrogênio do meio de cultura. Os metabólitos mais importantes são a bicaverina e a norbicaverina (Mac MILLAN, 1997; GRAEB, 1988).

A concentração de giberelinas nas partes vegetativas das plantas é da ordem de  $\mu\text{g/kg}$ , e nas partes reprodutivas, da ordem de algumas dezenas de  $\text{mg/kg}$  de planta fresca. Devido às baixas concentrações, a extração de giberelinas em escala comercial não é economicamente viável (SATO, 1994).

Dada a relevância das giberelinas como estimuladoras no crescimento de plantas, houve um significativo aumento de estudos da sua produção e isolamento. Stodola *et al.* (1955) examinaram um número de cepas de *F. moniliforme* e encontraram a NRRL 2284 com capacidade de produzir giberelina com bom rendimento.

Borrow *et al.* (1955) testaram várias cepas de fungos isolados de uma planta infectada e nove culturas apresentaram a atividade “*Bakanae*”. Utilizaram como meio de cultura: glucose (40 g L<sup>-1</sup>); tartarato de amônio (9,5 g L<sup>-1</sup>); fosfato monobásico de potássio (2,0 g L<sup>-1</sup>) e sulfato de potássio (0,2 g L<sup>-1</sup>).

Uma patente relata um novo ácido orgânico com propriedades sobre o crescimento de plantas, utilizando o método de sua produção em meio líquido através do fungo *G. fujikuroi*. O melhor rendimento de ácido giberélico foi de 312 mg L<sup>-1</sup>, obtido em 402 h de fermentação, com concentração de 2,4 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 16% de glucose (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES, 1957).

Borrow, Jefferys e Nixon (1958) compararam o efeito da adição de dióxido de carbono na aeração do meio de cultura da *G. fujikuroi* em fermentadores de 30 litros, mantendo-se o meio de cultura com a mesma composição, a adição de 1,5 litro de dióxido de carbono mais 40 litros de ar por minuto. Nessas condições, houve melhora do rendimento em 32.58 %, quando comparado com o meio somente aerado com 40 litros de ar por minuto.

Borrow, Jefferys e Nixon (1960) patentearam um método de produção do ácido giberélico em dois ou mais estágios de cultivo. O primeiro estágio, descrito como de crescimento do fungo e o segundo, com a desaceleração deste e com produção do ácido. Apresenta ainda, as características do meio de cultura destas duas fases, onde na primeira etapa de fermentação o meio é balanceado e na fase final, existe a restrição de um ou mais elementos do meio, preferencialmente o nitrogênio. Nesta fase a relação C/N poderá variar entre 25:1 e 200:1, sendo a faixa mais recomendada entre 30:1 e 55:1. As maiores produções de ácido giberélico foram determinadas entre 160 e 260 h, com produções entre 200 e 436 mg L<sup>-1</sup>.

A manutenção de alta disponibilidade de fonte de carbono durante a fermentação, mediante a adição ao meio foi motivo de nova patente de Borrow, Jefferys e Nixon (1960). Desta maneira conseguiu-se uma alta taxa de crescimento do fungo para satisfazer a quantidade de carbono necessária à produção de ácido giberélico no estágio de produção. A fonte preferida de carbono é um açúcar como sacarose ou glucose. Controlar o excesso de carbono é essencial para prevenir uma inibição da produção até o final da fase. A concentração de açúcar considerada ótima situa-se na faixa de 1 a 4% massa/volume do meio. O maior rendimento obtido em um dos exemplos, se deu com 472 h de fermentação e com 1002 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico.

O meio de cultura após extração do ácido giberélico também foi objeto de patente. Os resíduos após secagem foram destinados à alimentação animal, em grande parte por seu balanceamento em nutrientes essenciais, e alto teor de vitamina B<sub>12</sub> (PENSACK; CHORNOCK, 1961).

Borrow *et al.* (1961) avaliaram diferentes composições de meios de cultura, alterando basicamente as fontes de fósforo e enxofre. Utilizaram ainda, fermentadores com 30 e 80 litros, agitação de 600 e 425 rpm, respectivamente. Esses autores avaliaram a morfologia do fungo, mudanças no pH, acúmulo de fosfolipídios e carboidratos e absorção de nutrientes. Estabeleceram ainda que a fermentação apresentava três estágios: fase balanceada, estocagem e de manutenção. Na primeira fase observou-se, crescimento exponencial e estabilização da biomassa microbiana, atribuída à severa restrição de oxigênio. Não houve produção de giberelinas. A etapa de estocagem foi definida pela paralisação da proliferação microbiana em decorrência da exaustão do nitrogênio, com início da produção de giberelinas. E na última etapa, de manutenção, com presença ainda de glucose no meio, dá-se a produção de giberelinas, que continua ainda com o consumo de toda a glucose, tendo o fungo utilizado reserva de gordura acumuladas na fase balanceada.

Mertz (1970) mostrou o efeito nas culturas de *G. fujikuroi* que cresceram sob contínua iluminação de 1800 lux, com alta relação C/N (37:6), adição de 50 ppm de cálcio e com dois níveis de glucose (2 e 4%) comparadas com culturas em ausência de luz, baixa relação C/N (9:4) e sem adição de cálcio. A maior produção de giberelinas ocorreu em fermentação na presença de luz, com alta relação C/N (37:6) e com adição de cálcio, apresentando ainda nessas condições uma incorporação de 63% mais L-leucina, disponível para a síntese de giberelinas e maior biomassa, expressa em peso seco do micélio.

A utilização de efluentes de indústrias de alimentos, ricos em lactose e gorduras do leite, proteínas e ácido láctico foram empregadas compondo o meio de cultura, em processos fermentativos para a produção de ácido giberélico. O fungo *Fusarium moniliforme* foi imobilizado em um gel de alginato de sódio, obtendo rendimento máximo de 680 mg L<sup>-1</sup>, em condições de pH 5,5 e temperatura de 25 – 26 °C, por doze dias de fermentação em agitador orbital (KAHLON; MALHOTRA, 1986).

Jones e Pharis (1987) compararam a produção de giberelinas com células de *G. fujikuroi* imobilizadas em carragena e células livres, com o objetivo de avaliar a longevidade da fase de produção de metabólitos secundários, em ambos os sistemas. Conseguiu-se com este procedimento a produção da bicaverina e giberelina por até 16 dias, tendo pico de produção de giberelina aos 14 dias, sendo 74% superior, no sistema de células livres ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A produção comercial de ácido giberélico pelo fungo *G. fujikuroi* pode se dar em condições de cultura submersa, aeração, meio enriquecido com glucose, sais minerais, temperatura de incubação de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$  e pH levemente ácido. A produção inicia em aproximadamente três dias com acumulação de ácido giberélico vagarosamente, acompanhando o crescimento do fungo (GELMI *et al.*, 2000; ATLAS, 1996).

Após a exaustão das fontes de nitrogênio, o crescimento exponencial do fungo cessa e o metabolismo secundário é desarmado, com concomitante biossíntese de giberelinas, principalmente  $\text{GA}_3$  (FERNANDES-MARTINS *et al.*, 2002; PÉREZ-CORREA; AGOSIN, 2000).

Os primeiros processos descritos para extração de giberelinas foram os empregados pelos pesquisadores japoneses. Utilizava-se da adsorção em carbono e posterior percolação com um solvente miscível em água, geralmente acetona ou metanol, isoladamente ou adicionados de amônia. Entretanto, a manipulação de grandes quantidades de solventes era um grande inconveniente quando de sua recuperação no processo industrial. A recuperação de giberelinas pela adsorção em colunas com resinas trocadoras de ânions foi objeto de patente. Nas colunas se eluía o meio de cultura adicionado de um hidróxido ou sal de um metal alcalino terroso, com a função de precipitar, purificando o meio, eliminando fosfatos, sulfatos, tartaratos, citratos, substâncias corantes e proteínas. O ácido giberélico é facilmente adsorvido, sendo retido na coluna quando da percolação do meio de cultura. Em seguida a coluna era lavada com 200 mL de água. A extração do ácido giberélico se dava pela passagem de ácido fórmico a 4 %, seguidos da passagem de amônia, à taxa de  $0,2 \text{ mL cm}^{-2} \cdot \text{mm}^{-1}$ . A coluna descrita apresentava diâmetro de 4,0 cm, comprimento de 20 cm e volume próximo de 200 mL, tempo de eluição aproximadamente doze horas. O pH variava de 3,8 no início da eluição e ao final se aproximava de pH 8,5; no início contendo mais giberelina e ao final mais impurezas (SOCIETE D'ETUDES ET D'APPLICATIONS BIOCHIMIQUES, 1963).

## 2.6 ESTEVIOL COMO PRECURSOR DO ÁCIDO GIBERÉLICO PELO METABOLISMO DA *G. Fujikuroi*

As giberelinas são conhecidas como metabólitos de fungos e ou como hormônios endógenos de plantas superiores. Um dos aspectos mais interessantes de sua estrutura está relacionado com a posição da hidroxila no C-13, pois isto revela aspectos tanto da biossíntese, como da atividade fisiológica das giberelinas. Muitas giberelinas fúngicas, carecem da hidroxila na posição C-13, enquanto as que normalmente a possuem, pertencem ao grupo das giberelinas de plantas superiores. As giberelinas C-13 hidroxiladas ocorrem somente em plantas superiores (MOROFUSHI *et al.*, 1982).

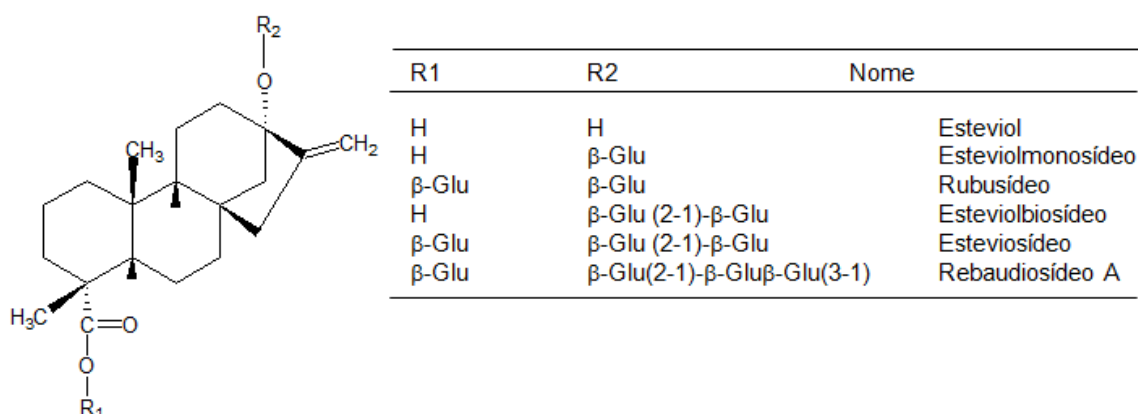
Então, apesar da importância C-13 hidroxiladas nos estudos sobre a fisiologia das giberelinas em plantas, somente uma pequena quantidade destas GAs podem ser obtidas a partir delas. A conversão de alguns precursores contendo a hidroxila em posição C-13, em GAs pela *Gibberella fujikuroi* é relatada como extremamente importante. O esteviol, uma aglicona do esteviosídeo, obtido a partir de folhas da *Stevia rebaudiana*, pode ser um precursor e seu metabolismo pela *G. fujikuroi* é realmente interessante (KIM; SAWA; SHIBATA, 1996).

As folhas de *Stevia rebaudiana*, estêvia, originárias do Paraguai e sudoeste do Brasil, contém glicosídeos que são extraídos e produzem um adoçante natural que adoça trezentas vezes mais que o açúcar da cana e pode ser consumido pelos diabéticos. Sendo planta perene, requer dias longos. A produção por sementes é baixa, sendo a propagação vegetativa mais efetiva (ANDOLFI; CECCARINI; MACCHIA, 2002). É uma planta herbácea, com aproximadamente 80 cm de altura, vida útil de seis anos, com até quatro cortes anuais. Produz até 1200 kg/ha de folhas por corte, gerando uma receita de R\$ 2.570,00 por hectare. Existem somente quinze empresas no mundo que fabricam o adoçante, entre elas a Steviafarma Industrial AS, no Norte do Paraná, que produz 30 t mensais de produto bruto. Têm mercado internacional, sendo o Japão um dos maiores importadores. Nos Estados Unidos é permitida sua comercialização apenas como suplemento alimentar, não ainda como adoçante natural (IORE, 2004).

O NEPRON-DBQ da UEM (Núcleo de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá) em três anos de execução do projeto - "Aplicações Biotecnológicas de Produtos de *Stevia rebaudiana*, Bertoni", analisou cerca de 4000

plantas de estêvia. A variedade *Stevia* UEM 320 apresentou 17,5% de edulcorantes totais contra um teor médio de 10% para uma planta típica. Porém, deve-se ressaltar que nessa planta o edulcorante majoritário é o rebaudiosídeo tipo A, enquanto que numa planta típica o principal edulcorante é o esteviosídeo. Em uma planta comum a razão rebaudiosídeo A/esteviosídeo é de 0,5, enquanto que na variedade *Stevia* UEM 320 esta razão atinge o valor de 2,1. Quando maior a razão rebaudiosídeo A/esteviosídeo, melhor a qualidade de dulçor da planta (NEPRON, 2004).

As folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, espécie pertencente à família *Compositae*, acumula os chamados, adoçantes de estêvia, na proporção de 5-10% de seu peso seco. Os constituintes principais são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo-A (Figura 4).



**Figura 4 - Estrutura do esteviol e seus glicosídeos**  
Fonte: Shibata (1995)

A hidrólise do esteviosídeo se processa de uma forma complexa, possivelmente com formação de muitos compostos intermediários.

Um modelo deve obrigatoriamente levar em conta a retirada sequencial das glaucoses do carbono 13, o que redunda na formação de quatro tipos de compostos intermediários.

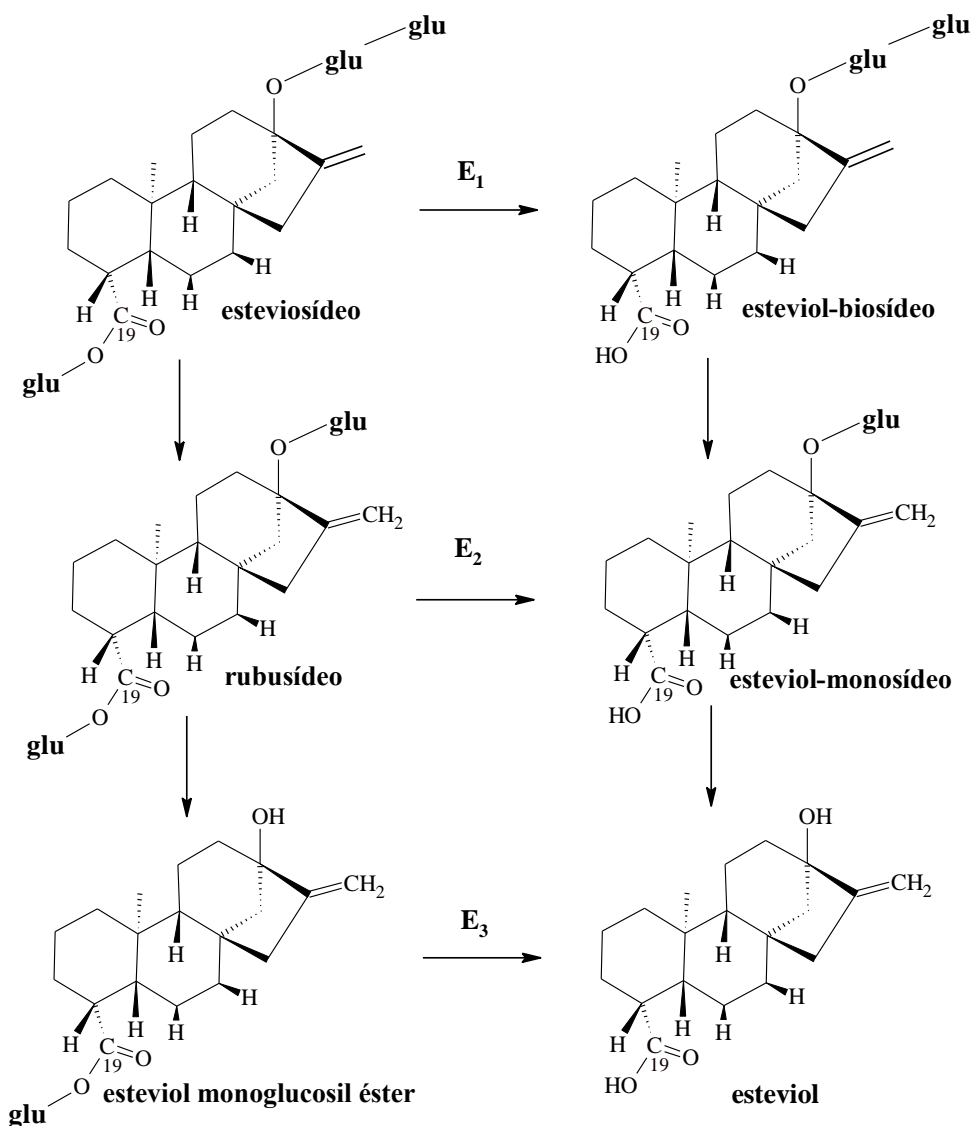
Este modelo segundo Chimelli (2003), com quatro compostos intermediários, só é possível se levarmos em conta duas hipóteses (Figura 5):

[1] que exista apenas uma enzima envolvida na retirada da unidade de glucose da carboxila, cujo substrato seja indistintamente o esteviol monosídeo, o rubusídeo ou o esteviol monoglicosil éster.

Na figura 5,  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$  seriam uma única enzima, atuando sobre substratos distintos.



[2] que  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$  sejam enzimas distintas.



**Figura 5 - Modelo de hidrólise de retiradas sequenciais das glucoses do carbono 13 em quatro intermediários possíveis**  
**Fonte: Chimelli (2003)**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para os experimentos com as cepas de *Gibberella* foi empregada incubadora, com agitação orbital termostatzada, marca TECNAL, modelo TE 421, com ajuste do limite de superaquecimento.

Os trabalhos em condições assépticas foram realizados em fluxo laminar vertical marca TROX modelo FLV série 293 (Curitiba – PR), enquanto a esterilização de materiais foi realizada em autoclave marca FABBE modelo 108 série 6779 (São Paulo – SP).

O esteviosídeo foi fornecido pela Steviafarma Industrial S.A., situada em Maringá, Paraná.

Na determinação do pH nos meios de reação usou-se um pHmetro MICRONAL modelo B 374 (São Paulo – SP). As pesagens foram feitas com balança MARTE: modelo AS 2000 (São Paulo – SP), ou com balança OHAUS modelo Explorer (Pine Brook – NJ - USA).

A incubação dos meios sólidos deu-se em estufa marca FABBE (São Paulo – SP) modelo 108 série 6779, enquanto as dessecações ocorreram em estufa FANEM modelo 315 SE (São Paulo – SP). As centrifugações foram realizadas com centrífuga refrigerada SIGMA modelo 4K15 (Osterode – Alemanha) usando-se rotor número 11156 121/00. Os tubos usados foram do tipo Falcon, de 50 mL.

As ultrafiltrações foram feitas com filtro MILLIPORE I.C.L. tipo HA de 0,45 µm (Billerica – MA – USA) e com filtros Cole-Parmer de 0,2 µm.

As leituras na dosagem de glucose foram realizadas em espectrofotômetro SHIMADZU – UV 1601 (Quioto – Japão).

Para Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizou-se como adsorvente sílica Si-60 F254 (Merck, art. 5554) com espessura de 0,2 mm. As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução metanólica de ácido sulfúrico (50%) e aquecimento e/ou irradiação no UV, com comprimento de onda 254 e 365 nm.

As análises quantitativas de giberelinas e de esteviol foram analisadas em sistema CLAE analítico marca Varian (Palo Alto – CA - USA); bomba quaternária

(modelo 9012Q), detetor UV fotodiodo (modelo 9065) e injetor automático (modelo AI200) coluna C-18 marca Rainin, 5  $\mu$ m (4,6 X 250 mm). A água usada nas análises foi primeiramente destilada, em destilador de água, tipo Pilsen marca FABBE, modelo 106 (São Paulo –SP), bidestilada em destilador de água de vidro marca MARTE, modelo MB 10.02 (São Paulo – SP) e depois passada em purificador de água marca MILLIPORE (São Paulo –SP), modelo Simplicity 185.

As amostras foram preparadas pelo método da extração em fase sólida com ajuda de um sistema de preparação de amostras a vácuo marca Varian, modelo Vac Elut 20 (Palo Alto – CA - USA) e centrifugadas em microcentrífuga marca LABNET, modelo Force 7 (Woodbridge – NJ – USA).

A conservação de cepas e demais amostras foi realizada em refrigerador Electrolux Frostfree DFF 44 - PREMIUN.

As purificações do esteviosídeo, esteviol e 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol foram realizadas por Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga (CCDC) usando-se aparelho Chromatotron (Harrison Research - Palo Alto – CA - USA) e Evaporador rotatório marca TECNAL, modelo R114. O isolamento dos produtos foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga (CCDC). Utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art. 7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 2.0 mm.

## 3.2 MICRORGANISMOS

### 3.2.1 Fungos

Foram usadas seis cepas da *Gibberella fujikuroi* (cepa s<sub>1</sub>, cepa s<sub>2</sub> e cepa s<sub>3</sub>, 2278, 3326 e D41221), pertencentes a micoteca particular do laboratório de Produtos Naturais e Biotransformações do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Outros fungos foram cedidos pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel, do Departamento de Patologia Básica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Alguns foram isolados de plantas de soja (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*) e outros de folhas de milho (*Colletotrichum*, *Fusarium* e *Penicillium*), coletados em campo com vinte e quarenta dias, do início do desenvolvimento das culturas, respectivamente. Outro

fungo endofítico, filamentoso, sem espécie determinada, também fez parte da coleção.

### 3.2.2 Preservação das Culturas

A preservação se deu em Meio Sólido Complexo (MSC) com a composição: 20 g de extrato de levedura e 12 g de ágar em 1000 mL de água destilada. O meio foi obtido pela homogeneização dos componentes do meio em água, aquecendo-os até o ponto de fervura e vertendo-os aos tubos, vedando-se em seguida com tampão, levados à autoclave por vinte minutos a temperatura de 121 °C e pressão de 110 kPa man. Após o resfriamento da autoclave, os tubos foram inclinados para a solidificação do meio. Os tubos após a repicagem de micélio ou parte da colônia foram mantidos em estufa a 29 °C, por quatro dias. Os tubos com as culturas já formadas e envolvidas em filmes plásticos foram mantidos em posição inclinada, em geladeira à temperatura de 5 °C, por período de até três meses.

### 3.2.3 Reativação das Culturas

Utilizou-se o Meio *Sabouraud* Modificado (MSM): 10 g de peptona; 40 g de sacarose; 20 g de ágar; 2 mL de solução traços de elementos e completar com água para o volume 1000 mL. A Solução Traços de Elementos (STE) era composta por 0,010 g de nitrato de cobalto. 6H<sub>2</sub>O; 0,100 g de sulfato de ferro. 7H<sub>2</sub>O; 0,015 g de sulfato de cobre. 5H<sub>2</sub>O; 0,161 g de sulfato de zinco 7H<sub>2</sub>O; 0,010 g de sulfato de magnésio 7H<sub>2</sub>O; 0,100 g de molibdato de amônio. 4 H<sub>2</sub>O e água destilada para completar o volume de 100 mL.

As cepas de *G. fujikuroi* e demais microrganismos foram inoculadas neste meio de cultura, no interior de capela de fluxo laminar a partir de porção de micélio ou de colônia retirados do meio.

### 3.3 CONVERSÃO DO ESTEVIOSÍDEO EM GIBERELINAS

#### 3.3.1 Meios de Cultura para a Seleção dos Microrganismos

Utilizou-se o meio ICI 10% com a seguinte composição: 80 g de glucose; 2.4 g de nitrato de amônio; 5.0 g de fosfato de potássio di-hidrogenado; 1 g de sulfato de magnésio.  $10\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mL da STE (Solução Traço Elementos); água para completar o volume de 1000 mL, ajustar para o pH 5.0, transferir alíquotas (50 ou 300 mL) para *Erlenmeyers* em seguida autoclavados por 20 minutos a temperatura de 121 °C e pressão de 110 kPa man.

Para a seleção foram utilizados *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido, ao qual foi adicionado esteviosídeo na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2 Adição do Esteviosídeo ao Meio Fermentativo

Esses experimentos foram realizadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio ICI 10%. Após autoclavadas por 20 minutos a temperatura de 121 °C e pressão de 110 kPa man, foram resfriadas e mantidas em câmara de fluxo laminar. Preparam-se soluções estoque de esteviosídeo, dissolvendo-se 2 g de esteviosídeo em 10 mL de água destilada, obtendo a concentração de 200 mg mL<sup>-1</sup>, volume suficiente para a adição nos experimentos. Em seguida, foram filtradas com filtro absoluto e adicionadas ao meio de cultura, com concentração definida de 2 mg mL<sup>-1</sup> ou concentrações crescentes de 1, 2 e 3 mg mL<sup>-1</sup>. A produção do inóculo foi realizada a partir de cultura de *Gibberella fujikuroi* cepas s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> armazenadas em tubos ensaio, com meio MSM. Em câmara de fluxo laminar, parte do micélio foi retirada com alça de platina e transferido para os frascos previamente autoclavados, permanecendo 48 h em agitador orbital, à temperatura de 29 °C e 120 rpm. Uma alíquota de 2 mL do inóculo das cepas de *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, eram adicionadas ao restante dos frascos já autoclavados e levados ao agitador, nas condições já descritas, pelo período de oito dias de fermentação. O experimento em escala preparativa visava produzir quantidade de GA<sub>3</sub>, ou metabólito intermediário a partir do esteviosídeo ou esteviol. O esteviosídeo era diretamente adicionado ao meio,

antes da autoclavagem e em triplicata. Os frascos de controle eram obtidos sem a adição de esteviosídeo ou esteviol.

### 3.3.3 Análise Qualitativa do Ácido Giberélico

Após encerramento da fermentação, filtrou-se a vácuo o material contido nos frascos, separando-se a biomassa que foi lavada com 40 mL (2 x 20) de acetato de etila. Recolhido em funil efetuou-se a separação das fases, orgânica e aquosa e concentrando-se em rota-evaporador, obteve-se o extrato bruto que em seguida foi analisado.

A análise qualitativa das giberelinas foi efetuada em CCD (cromatografia em camada delgada). A fase móvel era composta de clorofórmio, acetato de etila e ácido acético (4,0: 6,0: 0,1). As placas foram pulverizadas com a mistura ácido sulfúrico/metanol (1:1), aquecidas com pistola de ar quente e visualizadas sob lâmpada ultravioleta de 366 nm, utilizando-se uma amostra autêntica como padrão, com Rf de aproximadamente 0,4.

### 3.3.4 Elaboração da Curva Padrão para Quantificação do GA<sub>3</sub>

A determinação de giberelinas foi feita pelo método de calibração externa. Para isso, foi construída uma curva de calibração com soluções de GA<sub>3</sub> na concentrações finais 505 µg mL<sup>-1</sup>; 252,5 µg mL<sup>-1</sup>; 125,25 µg mL<sup>-1</sup>; 63,12 µg mL<sup>-1</sup> e 31,56 µg mL<sup>-1</sup>. Foi injetada 20 µl de cada uma das soluções no sistema cromatográfico e a eluição foi feita com solução acetonitrila-água (30:70) nos primeiros seis minutos e acetonitrila-água (90:10) no restante do tempo de 13 minutos. Estas soluções foram analisadas por CLAE com detector ajustado para absorbância em 205 nm.

### 3.3.5 Experimentos em Escala Analítica

A seleção das cepas produtoras de ácido giberélico foi realizada com os fungos *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* (isolado de soja),

*Colletotrichum* (isolado de milho), *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> provenientes de tubos com meio *Sabouroud* Modificado inclinado, inoculados em dois frascos contendo 50 mL de meio ICI 10%.

Em seguida os frascos foram levados a um agitador orbital e mantidos a 29 °C e 180 rpm por 48 horas, para o desenvolvimento do microorganismo. Após este período, 50 mg esteviosídeo foi adicionado a um dos frascos. O outro frasco foi mantido como controle. Após a adição do esteviosídeo, a fermentação foi conduzida por 7 dias. O conteúdo dos frascos foi então filtrado a vácuo e o líquido foi extraído com acetato de etila (3x20 mL). O micélio, remanescente no papel filtro, foi lavado com o mesmo solvente e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio anidro. Após a filtração e evaporação em rotavapor, obteve-se o extrato bruto, analisado por CCD, utilizando-se como fase móvel clorofórmio: acetato de etila: ácido acético, na proporção de 40: 60: 1, comparando-se com o padrão do ácido giberélico.

### 3.3.6 Determinação da Biomassa

Os experimentos com produção de giberelinas e biotransformações, a partir de esteviosídeo ou esteviol, tiveram as determinações de biomassa realizadas por separação em papel filtro previamente dessecado com massa determinada, desidratados em estufa a 70 °C até massa constante.

### 3.3.7 Otimização da Limpeza da Amostra

A limpeza das amostras foi feita pela técnica de extração em fase sólida (EFS). Quinhentos miligramas de sílica C18 foram empacotados em seringas de 5 mL e deixados em acetonitrila por um mínimo de 12 horas. Depois disto à sílica de cada seringa foi lavada com mais 5 mL de acetonitrila e 10 mL de água ultrapura, usando-se o sistema de preparação de amostras a vácuo. Ao final de cada experimento uma alíquota de 5 mL foi passada pela coluna apenas sob ação da gravidade, seguida de lavagem por 10 mL de água ultrapura, sob vácuo. A eluição dos analitos deu-se com solução de acetonitrila-água em proporções de 80:20 no

caso das giberelinas e 60:40 no caso do 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol. Ao final, completou-se o volume de cada alíquota para 5 mL em balão volumétrico. A solução foi então analisada por CLAE.

### 3.3.8 Otimização da Limpeza da Amostra Comparando a Sílica C-18 e PC-18

A sílica C-18 foi preparada conforme descrito no item 3.3.7. Trezentos miligramas de sílica PC18 foram empacotados em seringas de 5,0 mL, deixados em acetonitrila por uma hora. Em seguida, a sílica de cada seringa foi lavada com mais 3 mL de acetonitrila e 10 mL de água ultrapura, usando-se o sistema de preparação de amostras a vácuo.

Ao final do experimento uma alíquota de 5 mL foi passada pela coluna apenas sob ação da gravidade, seguida de lavagem por 10 mL de água ultrapura, sob vácuo. A eluição dos analitos deu-se com solução de acetonitrila-água em proporções de 60 para 40 no caso das giberelinas. Ao final completou-se o volume de cada alíquota para 5 mL em balão volumétrico. A solução foi então analisada por CLAE.

As seringas contendo C-18 e PC-18, após a obtenção das amostras foram lavadas com 3 mL de metanol e mais 7 mL de água ultrapura sob vácuo. Para condicionamento das colunas com PC-18, foram passados 3 mL de acetonitrila, devendo ser mantidas preenchidas com acetonitrila para uso futuro.

### 3.3.9 Biotransformação do Esteviosídeo nas Concentrações de 1, 2 e 3 mg mL<sup>-1</sup>

Em frascos de 250 mL, com 50 mL de meio ICI 10%, previamente autoclavados, foram inoculadas as duas cepas, provenientes de tubos com meio *Sabouroud* Modificado inclinado, levados a um agitador orbital e mantidos a 29 °C e 180 rpm por 48 horas, para o desenvolvimento do microorganismo. Foram, após este período, vertidos para frascos de 1000 mL, com 300 mL de meio ICI 10%, levados a pH 5,0 e, em seguida, autoclavados. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração de esteviosídeo descrita, além do controle. Todas estas operações foram efetuadas em câmaras de fluxo laminar.



### 3.3.10 Biotransformação do Esteviosídeo para Ácido Giberélico em Escala Preparativa

O procedimento foi similar ao descrito em escala analítica, neste caso, utilizou-se apenas os fungos *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>. Seis *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura ICI 10%, mantidos em estoque, foram inoculados e levados ao agitador orbital nas mesmas condições descritas anteriormente por 48 h. Após este período, este inóculo foi vertido nos *erlenmeyers* de 1000 mL com meio de cultura autoclavado e esteviosídeo já adicionado, conforme descrito no item 3.3.2. Um outro *erlenmeyer*, sem o esteviosídeo, foi usado como controle. A fermentação foi conduzida como descrito em escala analítica. A mistura foi então filtrada a vácuo e o líquido foi extraído com acetato de etila (3 x 100 mL). A obtenção do extrato seco e análise qualitativa do ácido giberélico por CCD foi realizada conforme descrição anterior. Seguiu-se este mesmo procedimento, quando da biotransformação do esteviol em ácido giberélico.

### 3.3.11 Comparação de Inóculo Preparado com Glucose e com Esteviosídeo

Prepararam-se, em dois frascos de 250 mL com 50 mL de meio ICI 10%, ao que se chamou de frasco controle. Quatro frascos de 250 mL, sendo dois com 50 mL de meio ICI 10% e outros dois com meio ICI 10%\* modificados, retirando-se da formulação a glucose, foram preparados para comporem os inóculos. Doze outros frascos, foram preparados com meio ICI 10%, em seis adicionaram-se 2,0 mg mL<sup>-1</sup> e nos outros seis, 4,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo como fonte de carbono, formaram o experimento. Depois de ajustados a pH 5,0 os dezoito frascos, foram autoclavados por 20 minutos a temperatura de 121 °C e pressão de 110 kPa man. Após o resfriamento os frascos autoclavados foram mantidos em câmara de fluxo laminar.

As culturas das *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> provenientes de tubos com Meio *Sabouroud* modificado e armazenadas em geladeira foram utilizadas para a preparação dos inóculos. Parte de micélio ou de colônia das duas cepas, foram semeados em um frasco para cada cepa, em Meio ICI 10% (*G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>) e Meio ICI 10%\* modificado (*G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>). Em seguida, os quatro frascos foram levados a um agitador orbital e mantidos a 29 °C e 120 rpm por 48 horas, para o desenvolvimento dos microrganismos e obtenção dos inóculos.

Após este período, uma alíquota de 2 mL de cada um desses frascos foi inoculada, conforme planejamento do experimento (Tabela 1), em câmara de fluxo laminar e em seguida levados ao agitador orbital, a 120 rpm e à temperatura de 29 °C, a fermentação foi conduzida por 7 dias.

**Tabela 1 - Planejamento do experimento com diferentes preparações de inóculo e meio de biotransformação**

Ensaio	Inóculo	Concentração do esteviosídeo (mg mL <sup>-1</sup> )
Controle (G. f. s <sub>1</sub> e s <sub>2</sub> )	Meio ICI 10%	Ausência
A (G. f. s <sub>1</sub> )	Meio ICI 10%	2
B (G. f. s <sub>2</sub> )	Meio ICI 10%	2
C (G. f. s <sub>1</sub> )	Meio ICI 10%*	4
D (G. f. s <sub>2</sub> )	Meio ICI 10%*	4

\* meio modificado

O conteúdo dos frascos foi então filtrado a vácuo e extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). O micélio, remanescente no papel filtro, foi lavado com o mesmo solvente e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio anidro. Após a filtração e evaporação em rotavapor, obteve-se o extrato bruto que foi analisado por CCD, utilizando-se como fase móvel clorofórmio: acetato de etila: ácido acético, na proporção de 40: 60: 1; comparando-se com o padrão do ácido giberélico.

### 3.3.12 Avaliação da Biotransformação do Esteviosídeo em Diferentes pHs

As cepas de *Gibberella fujikuroi*, s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, foram testadas para a biotransformação do esteviosídeo em GA<sub>3</sub>, nos pHs 3.0, 5.0, e 7.0. O inóculo foi produzido a partir de repicagem das culturas reativadas em meio Sabouraud Modificado, onde parte do micélio foi transferido, para *erlenmeyers* de 250 mL com meio ICI 10%, e deixado por dois dias em agitação, a 120 rpm na temperatura de 28°C.

Foram preparados 24 *erlenmeyers* de 250 mL com 50 mL de meio ICI 10%, grupos de oito frascos tiveram o pH, ajustados para: 3.0, 5.0 e 7.0; respectivamente e em seguida autoclavados. Os inóculos das cepas s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, foram então adicionados ao meio de cultura, 12 frascos para cada cepa. Após 48 horas do início da fermentação, 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo foram adicionados em triplicata, para

cada cepa, em pHs distintos, formando nove frascos (experimento) e três, sem o composto (controle). O experimento foi conduzido por sete dias em incubação em agitação, a 120 rpm na temperatura de 28 °C. O conteúdo dos frascos após o tempo de fermentação foi então filtrado a vácuo em papel filtro previamente seco em estufa e pesado, lavado com 30 mL de tampão fosfato pH 8,5 e, em seguida, levado a pH 3,5 com a adição de HCl 0,1 N. Aferiu-se o volume para 100 mL e retiradas alíquotas de 5 mL para análise quantitativa em CLAE. A biomassa foi determinada por diferença de massa, após constante quando desidratada em estufa a 70 °C.

Outro experimento foi realizado para definir mais claramente a influência do pH na hidrólise do esteviosídeo no meio de biotransformação, sendo elaborado em pH 3, 4 e 5; seguindo-se exatamente a mesma metodologia acima.

### 3.3.13 Experimento com o Esteviosídeo como Única Fonte de Carbono

Nestes experimentos o meio ICI 10% foi modificado, sendo a glucose da sua fórmula, totalmente substituída pelo esteviosídeo para uma concentração final de 30 mg mL<sup>-1</sup>, que passou assim a se constituir na única fonte de carbono. Ao final das fermentações as amostras foram então tratadas e a concentração de giberelina foi determinada por CLAE.

### 3.3.14 Obtenção das Cepas de *G. fujikuroi* s<sub>1</sub><sup>2</sup> e s<sub>2</sub><sup>2</sup>

As cepas de *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> em câmara de fluxo laminar foram transferidas de meio sólido, para frascos de 250 mL com 50 mL de meio ICI 10% modificado, sem glucose e adição de 30 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo. Levadas ao agitador orbital por 7 dias de incubação, a 140 rpm e 29 °C. Após este período, tomou-se uma alíquota de 1 mL deste fermentado, inoculando-as em outros frascos com o meio descrito acima. Repetiu-se a incubação pelo mesmo período e nas mesmas condições, obtendo-se ao final o inóculo das cepas designadas como s<sub>1</sub><sup>2</sup> e s<sub>2</sub><sup>2</sup>.

### 3.3.15 Produção de GA<sub>3</sub> em Diferentes Condições de Inóculo e Meio de Cultura

Foram realizados seis experimentos em triplicata, em *erlenmeyers* de 250 mL, com 50 mL de meio ICI 10%\* modificado, sendo um frasco, controle para cada ensaio com meio ICI 10% sem alterações. Tanto os experimentos como os controles foram realizados em pH 5. Os inóculos foram obtidos nas condições abaixo.

O inóculo 1 foi obtido pela repicagem de micélio do fungo *G. fujikuroi* S<sub>2</sub>, reativado em tubo de ensaio Meio Sólido Complexo, já descrito, para um meio ICI 10% (g L<sup>-1</sup>) em câmara de fluxo laminar, levado ao agitador orbital a temperatura de 29 °C, em agitação de 140 rpm, por três dias.

O inóculo 2 foi produzido a partir do fungo *G. fujikuroi* S<sub>2</sub>, mantido em tubo de ensaio com o Meio Sabouraud Modificado, foi realizada a repicagem deste fungo em meio ICI 10% (g L<sup>-1</sup>) e procedendo-se a incubação nas mesmas condições de agitação, temperatura e tempo de fermentação, obteve-se então o inóculo.

O inóculo 3 foi obtido a partir do fungo *G. fujikuroi* S<sub>2</sub>, foi mantido em tubo de ensaio com o Meio Sabouraud Modificado, ao qual foi adicionado em sua composição 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo. Repicando este fungo em meio ICI 10% (g L<sup>-1</sup>) nas mesmas condições de incubação anteriores obteve-se então o inóculo.

O inóculo 4, obtido através do fungo *G. fujikuroi* S<sub>2</sub><sup>2</sup>, mantido em meio ICI 10% \* modificado, sem glucose e adição de 30 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo, foi transferido (5 mL) para o meio ICI 10% (g L<sup>-1</sup>), que incubado nas mesmas condições anteriores, levou à obtenção do inóculo.

Três diferentes meios de cultura foram preparados com modificações a partir do meio ICI 10% (g.L<sup>-1</sup>). Para compor o meio A, foi mantido o teor integral de glucose do meio ICI 10% (80 mg mL<sup>-1</sup>) acrescidos de 2 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo ao meio. O Meio B foi mantido apenas 25% de glucose (20 mg mL<sup>-1</sup>) e adicionado 1 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo ao meio. O meio C foi o ICI 10% (g.L<sup>-1</sup>) modificado, o qual recebeu apenas 50% de glucose (40 mg mL<sup>-1</sup>) e a adição de 1 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo ao meio. Depois de elevar ao pH 5, os frascos foram autoclavados. A tabela 2 relaciona os diversos ensaios e as condições em que foram realizados.

**Tabela 2 - Tipo de ensaio e condições de inóculo e meios de biotransformação**

Ensaio	Inóculo	Meio de Biotransformação
1	IV	A
2	I	A
3	III	A
4	II	A
5	II	B
6	II	C

Legenda: Inóculos

I- *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> reativado em MSC e desenvolvido em meio ICI 10% (g.l<sup>-1</sup>);

II- *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, reativado em MSM e desenvolvido em Meio ICI 10% (g.l<sup>-1</sup>);

III- *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, reativado em MSM ao qual se adicionou 1,0 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo e desenvolvido em meio ICI 10% (g.l<sup>-1</sup>);

IV- *G. fujikuroi* s<sub>2</sub><sup>2</sup>, mantido em meio ICI 10%\* modificado, sem glucose e com 30 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo e desenvolvido em meio ICI 10% (g.l<sup>-1</sup>)

Meios

A - ICI 10% (80 mg.ml<sup>-1</sup>) adicionado de 2,0 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo;

B - ICI 10% modificado (20 mg.ml<sup>-1</sup> de glucose) adicionado de 1,0 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo;

C - ICI 10% modificado (40 mg.ml<sup>-1</sup> de glucose) adicionado de 1,0 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo

As condições de biotransformação também foram distintas. Os ensaios que receberam o meio de cultura A, assim permaneceram até o final da biotransformação. Já, o ensaio que recebeu o meio B, após 48 horas do início da biotransformação, recebeu os 75% de glucose restantes (60 mg mL<sup>-1</sup>) e mais 1 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo. Por último, para o ensaio que recebeu o meio C, após 48 horas do início da fermentação, completou-se o meio com 50% de glucose (40 mg mL<sup>-1</sup>) e pela adição de 1 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata e um frasco controle. O controle teve o inóculo produzido de maneira idêntica ao do ensaio específico.

### 3.3.16 Cinética da Produção do GA<sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo

Utilizando o fungo *G. fujikuroi* cepa s<sub>1</sub>, a partir de MSC, foi produzido o inóculo em Meio ICI 10%, levados ao agitador rotatório à temperatura de 28 °C por 24 h. Preparou-se em 24 frascos de 250 mL, 50 mL de meio ICI, em pH 5,0 e em seguida autoclavados. Em câmara de fluxo laminar, 0,5 mL do inóculo previamente preparado, foi vertido para os frascos para a fermentação. Em 21 frascos, compondo sete triplicatas, foram adicionados 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo ao meio de cultura, totalizando 100 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo por frasco. Três frascos sem o esteviosídeo formavam os controles. Levados a seguir ao agitador rotatório, com 120 rpm e à

temperatura de 29 °C, iniciou-se a fermentação. Retirou-se, neste instante a primeira triplicata, chamada de tempo zero; a segunda triplicata foi retirada com 24 h; a terceira, com 48 h; a quarta, com 72 h e assim a cada 24 horas até a última triplicata com 192 h, correspondendo ao oitavo dia do início da fermentação.

Ao retirar cada triplicata, os frascos eram imediatamente congelados em freezer (-18 °C). Ao final do oitavo dia procedeu-se a extração da biomassa e preparação das amostras para análise em CLAE.

### 3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL EM GIBERELINAS

#### 3.4.1 Obtenção do Esteviol

O esteviosídeo (10 g) foi dissolvido em 500 mL de água, acrescentando-se 10 g de periodato de sódio. A mistura foi deixada em repouso por dezesseis horas no escuro. Após este período, adicionou-se hidróxido de potássio (7,5 g) até pH 12 e a mistura foi aquecida sob refluxo por uma hora. Após resfriamento com gelo, acidulou-se com ácido acético glacial até pH 4,0 adicionando-se 40 mL de bissulfito de sódio 1,0 N e a mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 250 mL). A fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro foi filtrada e o solvente foi evaporado no evaporador rotatório. O esteviol foi recristalizado com metanol, por três vezes, obtendo-se 4,79 g, comparado por CCD com amostra autêntica de esteviol quando eluídos em fase móvel hexano : acetonitrila (1:1) (OGAWA *et al.*, 1980).

#### 3.4.2 Biotransformação do Esteviol em 7β-hidroxiesteviol

O fungo, *G. fujikuroi* s<sub>1</sub>, foi cultivado em seis *erlenmeyers* de 1000 mL, com 250 mL de meio de cultura, em pH 4.5 e com os inóculos desenvolvidos, em frascos de 250 mL com 50 mL de meio. Foram dissolvidos no meio de cultura 500 mg L<sup>-1</sup> de esteviol, em três frascos, os outros três, sem o composto orgânico foram, o controle. A fermentação foi conduzida nas mesmas condições de temperatura e rotação, já descritas. Com 48 h, foram retirados dois frascos com o ensaio e seus controles respectivos. Após 96 h, retiraram-se os últimos frascos, um com o composto e o controle. A mistura foi filtrada a vácuo, sendo o filtrado extraído com acetato de etila

(3 x 100 mL), adicionados de sulfato de sódio anidro e o solvente teve seu volume reduzido em evaporador rotatório.

#### 3.4.3 Isolamento e Purificação do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol

Os extratos secos obtidos da biotransformação do esteviol e após analisados por CCD foram reunidos e dissolvidos no menor volume possível de metanol. A amostra foi fracionada em Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga, utilizando Chromatotron. Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 2,0 mm, tendo sido eluída com 4 x 50 mL de fase móvel hexano, acetato de etila, sendo 50 mL para cada uma das seguintes fases móveis: 80:20; 70:30; 50:50 e 30:70. A lavagem da placa foi efetuada com 100 mL de acetato de etila: metanol (80:20). Foram colhidos cinco tubos com 10 mL para cada fase móvel eluída, totalizando 20 tubos, os quais foram analisadas por CCD, usando-se a hexano: acetato de etila (1:1) como fase móvel da separação. As frações semelhantes foram reunidas e o solvente evaporado em rotavapor e novamente analisadas por CCD. A amostra com a substância desejada submetida à recristalização para completar sua purificação, tendo em seguida sua estrutura comprovada por RMN.

#### 3.4.4 Preparação do Diazometano

Nessa etapa, 5 g de hidróxido de potássio foram dissolvidos em 8,0 mL de água destilada e em 10 mL de etanol. Esta mistura foi colocada no frasco reacional com saída lateral e aquecida a temperatura de 65 °C. Um funil de separação, contendo solução a 5 g de metil-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida (Diazald) dissolvida em 50 mL de éter etílico, foi acoplado sobre o frasco reacional e à medida que o diazometano se formava era recolhido num frasco coletor e resfriado (VOGEL, 1989).

#### 3.4.5 Esterificação do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol com Diazometano

A solução de diazometano foi adicionada, lentamente, ao 7 $\beta$ -hidroxiesteviol até a permanência de uma coloração amarelada, observando-se uma efervescência devida à liberação de N<sub>2</sub>. A solução permaneceu amarelada, indicando um excesso de diazometano e término da reação. Este excesso de diazometano foi neutralizado com ácido acético.

#### 3.4.6 Teste do Hipocótilo

Prepararam-se soluções-estoque na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetona, para o GA<sub>3</sub>, e etanol, para o 7 $\beta$ -hidroxiesteviol. As diluições foram feitas em água destilada para atingir as concentrações de: 20; 10; 1,0; e 10<sup>-2</sup>  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sementes de alface (FELTRIN – Importadora de Sementes) foram imersas nas soluções por doze horas, inclusive o controle, que era uma solução de acetona, para o GA<sub>3</sub> e etanol para o 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol, nas mesmas concentrações, 1,0  $\mu\text{l mL}^{-1}$ . Foram utilizadas 60 sementes para cada concentração. Após este período, as sementes foram secas, e depositadas, em placas de Petri, umedecidas com água destilada contendo papel de filtro. Vinte sementes foram colocadas em cada placa. As placas contendo o material vegetal foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 28  $\pm$  2 °C fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e umidade relativa do ar igual 70  $\pm$  5 %. Ao fim deste tempo, o comprimento do hipocótilo de cada semente foi medido com paquímetro. Os dados obtidos foram tabulados por meio de histogramas (REEVE; ROZIER, 1975).

#### 3.4.7 Bioensaio de Aleurona de Cevada

As sementes de cevada foram colocadas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% por 2 horas, para descasque químico do pericarpo. Após este período o ácido foi decantado, os grãos foram lavados com água destilada para remover o excesso de ácido, de cascas e de outros fragmentos. Os grãos limpos foram secados em dessecador a vácuo durante uma noite. Em câmara de fluxo laminar, evitando contaminação, os grãos foram



cortados transversalmente à metade e seus embriões removidos. As partes cortadas foram irradiadas com luz UV por 15 minutos. O bioensaio foi conduzido em frascos de vidro com 5 mL. Neles, foram adicionados 10 pedaços de grãos para cada frasco, previamente autoclavado, contendo 1 mL do tampão acetato 0,2 mM (pH 4,8) e 20 mM de cloreto de cálcio. Foi preparada solução estoque do composto 7 $\beta$ , hidroxiesteviol, pesando-se 10 g do composto, dissolvidos em 2 mL de metanol a quente, completado volume em balão volumétrico para 10 mL. Preparando-se a partir dela a diluição a ser testada, de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções de ácido giberélico e esteviol foram preparadas da mesma forma e na mesma concentração. Os testes foram realizados em triplicata, para cada composto e uma triplicata controle, que não continha qualquer composto. A incubação foi realizada em agitador orbital por trinta e seis horas, com agitação em 110 rpm, à temperatura de 29 °C e na ausência de luz (REEVE; CROZIER, 1975, JONES; VARNER, 1967). Após este período, o hidrolisado foi retirado, centrifugado a 2000 g por dez minutos.

#### 3.4.8 Carboidratos Redutores – Método DNS

Os carboidratos redutores foram determinados pelo método do 3,5-dinitrossalicilato de sódio (DNS) descrito por MILLER (1959), com concentração de 1% e usando-se a D-glucose como padrão, na faixa de 0,18 a 3,6 mg por experimento, com volume de 10 mL, leitura a 540 nm. Uma alíquota de 0,5 mL do hidrolizado, depois de centrifugada, foi vertida em tudo de ensaio, adicionada de 1 mL de água e 1 mL do DNS. Os tubos foram colocados em fervura por 5 minutos e após completou-se o volume para 10 mL com água. Em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO COM PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO

#### 4.1.1 Seleção dos Fungos Possíveis Produtores de GA<sub>3</sub>

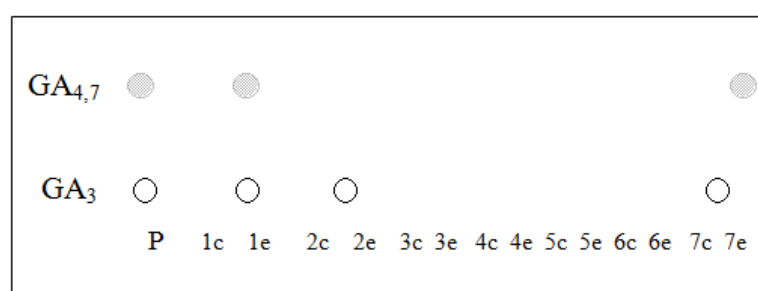
No primeiro ensaio, testou-se a capacidade de sete diferentes fungos em biotransformar o esteviosídeo em giberelinas. Os microrganismos foram inoculados em meio ICI 10% conforme descrito no item 3.3.1 de Material e Métodos. Após sete dias de incubação o experimento foi interrompido, procedendo-se então a extração e, em seguida, o produto foi analisado por CCD, estando os resultados indicados na tabela 3.

**Tabela 3 - Seleção dos fungos produtores de GA<sub>3</sub> e/ou GA<sub>4,7</sub> (n = 1)**

Fungos	GA <sub>3</sub>	GA <sub>4,7</sub>
1. <i>Gibberella. Fujikuroi</i> s <sub>1</sub>	+	+
2. <i>Gibberella fujikuroi</i> s <sub>2</sub>	+	-
3. <i>Gibberella fujikuroi</i> cepa D-41221	-	-
4. <i>Gibberella fujikuroi</i> cepa BC2	-	-
5. <i>Fusarium</i> sp*	-	-
6. <i>Gibberella fujikuroi</i> cepa 2278	-	-
7. <i>Gibberella fujikuroi</i> cepa 3326	+	+

Legenda: *Fusarium* sp\* - Fungo endofítico; fungos produtores de GA<sub>3</sub> e/ou GA<sub>4,7</sub> (+); fungos não produtores (-)

Por CCD, evidenciou-se a produção de giberelinas nos fungos *G. fujikuroi* s<sub>1</sub>, s<sub>2</sub> e cepa 3326 (Figura 6).

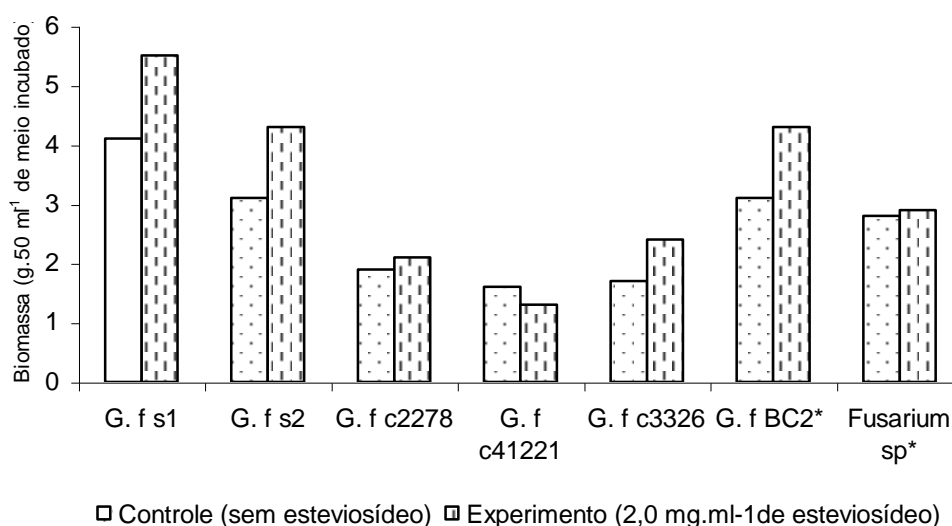


**Figura 6 - Representação gráfica do cromatograma da seleção das cepas**

Legenda: P = Padrão; 1 = *G. f* s<sub>1</sub>; 2 = *G. f* s<sub>2</sub>; 3 = *G. f* cepa D-41221; 4 = *G. f* cepa BC<sub>2</sub>; 5 = *Fusarium* sp\* 6 = *G. f* cepa 2278; 7 = *G. f* cepa 3326 e 1-7 (c) = controle

Este resultado positivo somente foi observado nos frascos onde se adicionou o esteviosídeo (experimento). Nos frascos controle, nenhuma produção foi encontrada. Realizou-se ainda um novo ensaio com o objetivo de confirmar a capacidade de biotransformação da *G. fujikuroi* cepas:  $s_1$ ,  $s_2$ , cepa 3326, cepa 2278, *Fusarium* sp\* e testar, um novo fungo, *G. fujikuroi* cepa BC<sub>2</sub>.

Os três fungos que já haviam apresentado resposta positiva em teste anterior foram novamente utilizados. O novo fungo testado não apresentou nenhuma capacidade de produção de giberelinas ou biotransformação do esteviosídeo, dando como produto final o ácido giberélico. A biomassa produzida nesse ensaio foi quantificada (Figura 7).



**Figura 7 - Biomassa produzida pelos fungos avaliados (n = 1)**

Legenda: G. f.  $s_1$  = *G. fujikuroi* cepa  $s_1$ ; G. f.  $s_2$  = *G. fujikuroi* cepa  $s_2$ ; G. f. c2278 = *G. fujikuroi* c2278; G. f. c41221 = *G. fujikuroi* c41221; G. f c3326 = *G. fujikuroi* c3326; G. f. BC<sub>2</sub>\* = *G. fujikuroi* BC<sub>2</sub>\*; *Fusarium* sp. = fungo endofítico.

Os fungos com produção de giberelinas apresentaram um rendimento de biomassa no experimento, ao menos vinte e cinco por cento, superior ao controle, possivelmente evidenciado por sua habilidade em metabolizar o esteviosídeo como fonte de carbono. O fungo *G. fujikuroi* cepa BC<sub>2</sub> apresentou alta biomassa no experimento, porem não foi detectada nenhuma capacidade de produção do metabólito. Portanto, essa relação biomassa/produção de GA<sub>3</sub>, ainda será mais bem analisada, uma vez que não foi possível nesse experimento, estabelecer qual é o nível de inter-relação entre ambas.

Embora, várias linhagens de *Fusarium moniliforme* sejam descritas como produtoras de giberelinas, esta cepa *Fusarium* sp. (endofítico) não apresentou nenhuma evidência de tal habilidade.

Outro teste, com as cepas de *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, foi realizado, com o meio de biotransformação nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo, onde se procurou avaliar o rendimento da produção de GA<sub>3</sub> nessas diferentes concentrações. Mediu-se também o pH e a biomassa dos experimentos, conforme a tabela 4.

Os ensaios mostraram que não houve aumento na produção de GA<sub>3</sub>, proporcional ao incremento de esteviosídeo no meio de fermentação. Isto pode ser parcialmente explicado, em função dos inúmeros fatores que interferem na fermentação e condições de hidrólise do esteviosídeo. O pH medido ao final da fermentação, apresentando valores médios na triplicata, entre 4,2 e 3,6 respectivamente para a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, sinaliza diferentes condições ótimas para a hidrólise do esteviosídeo e será ainda objeto de novas investigações.

Observou-se ainda, que a *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, apresentou um rendimento na produção de GA<sub>3</sub> variando entre 4,3 e 4,9 vezes superior, quando comparado com o controle, evidenciando a grande habilidade dessa cepa em biotransformar o esteviosídeo em GA<sub>3</sub>.

**Tabela 4 - Avaliação das cepas de *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> com relação a pH, biomassa e produção de GA<sub>3</sub> em diferentes concentrações de esteviosídeo (n= 3)**

Concentração de Esteviosídeo (mg mL <sup>-1</sup> )	Biomassa (mg mL <sup>-1</sup> )		Produção de GA <sub>3</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	
	G. fujikuroi			
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
Controle	5,6	5,2	3,6	4,0
1,0	5,6	6,3	5,1	17,0
2,0	5,0	5,2	5,1	18,4
3,0	7,7	5,6	7,2	19,5

Para a quantificação do GA<sub>3</sub> formado foi realizada uma curva de calibração com soluções de GA<sub>3</sub> nas concentrações finais 505 µg mL<sup>-1</sup>; 252,5 µg mL<sup>-1</sup>; 125,25 µg mL<sup>-1</sup>; 63,12 µg mL<sup>-1</sup> e 31,56 µg mL<sup>-1</sup> (vide seção 3.3.4). Essas soluções foram analisadas por CLAE com detetor ajustado para absorvância em 205 nm e a partir

delas, obteve-se a curva de calibração que se mostrou linear na faixa de concentração utilizada.

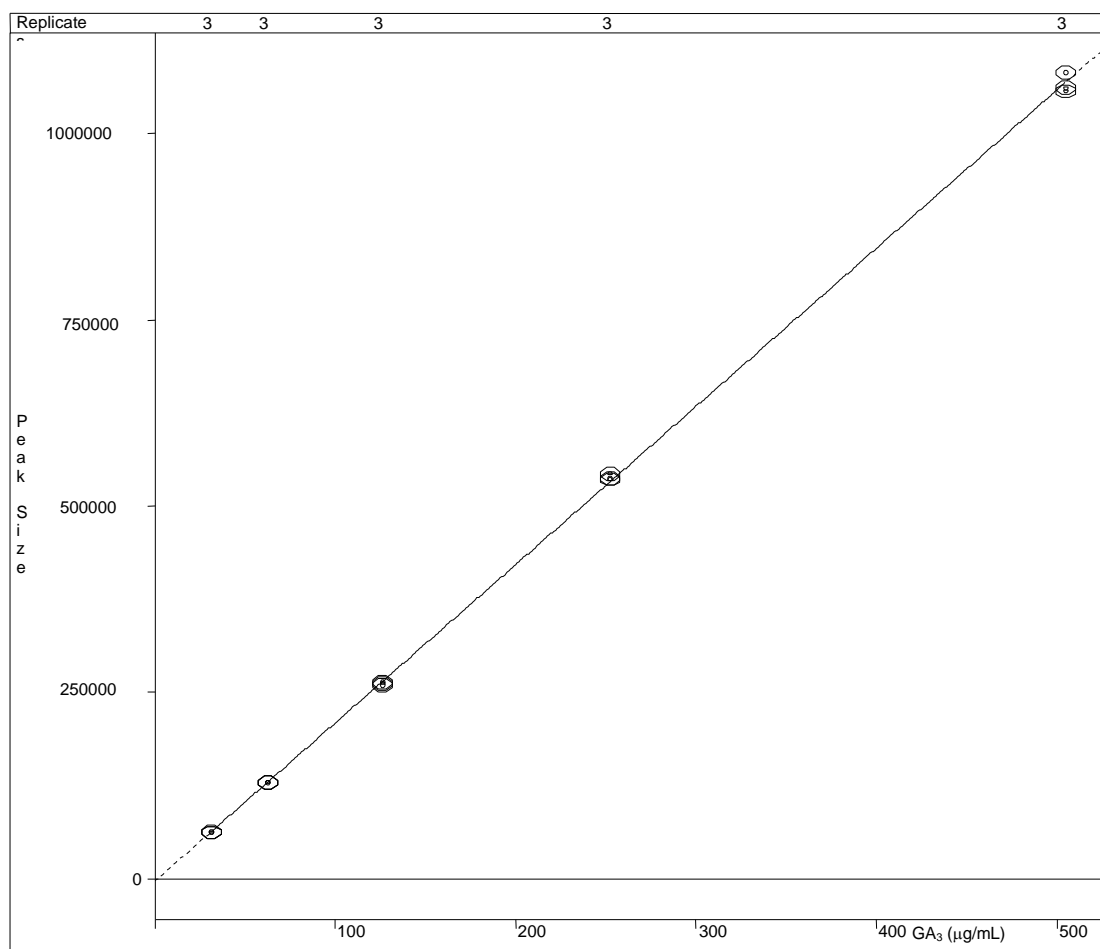
Calibration Curve Report

File: c:\star\data\ga3\ga3-2.mth

Detector: 9065 Polychrom, Address: 4, Channel ID: 4

Coeff. Det.( $r^2$ ): 0.999730

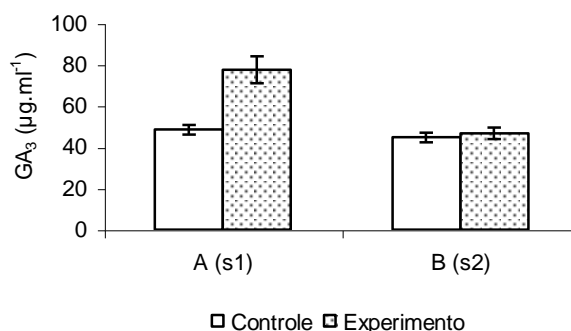
$y = +2.123039e+003x - 3.270874e+003$



**Figura 8 - Curva de calibração para o GA<sub>3</sub>**

#### 4.1.2 Efeito da Composição do Inóculo Sobre a Produção de GA<sub>3</sub>

Havia um ponto a ser avaliado no preparo do inóculo para futuras biotransformações. A substituição da glucose por esteviosídeo como fonte de carbono talvez pudesse trazer alguma vantagem ao microorganismo, melhorando a produção de GA<sub>3</sub>. Para tanto foi conduzido um experimento, onde foi suprimida a glucose no meio de cultura do inoculo (Figura 9).



**Figura 9 - Produção de GA<sub>3</sub> com inóculo preparado com e sem glucose (n = 3)**

Legenda: A(s<sub>1</sub>) e B(s<sub>1</sub>) = correspondem às cepas *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>; Controle = Meio ICI 10% (sem esteviosídeo); Experimento = Meio ICI 10 % adicionado de 2,0 mg.ml<sup>-1</sup> de esteviosídeo

Conforme descrição do experimento no item 3.3.10, os ensaios A e B, correspondem aos fungos *G. fujikuroi*. s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> obtidos a partir de inóculos com meio ICI 10%, com glucose. Acrescidos de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo no processo de fermentação, originando uma produção de GA<sub>3</sub> através de biotransformação. Os ensaios descritos como C e D (*G. fujikuroi*. s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, respectivamente) obtidos de inóculo em meio ICI 10% modificado e acrescidos no período de fermentação de 4,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo tiveram produção de GA<sub>3</sub> insignificante, não sendo possível sua quantificação.

O fungo *G. fujikuroi* s<sub>1</sub>, mostrou excelente capacidade de produção de GA<sub>3</sub>, tendo o esteviosídeo como precursor. Apresentou uma produção de 48,63 µg mL<sup>-1</sup> contra 77,67 µg mL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> produzida pelo experimento, representando um rendimento de 59,7 % superior, quando ao meio fermentativo é adicionado o esteviosídeo.

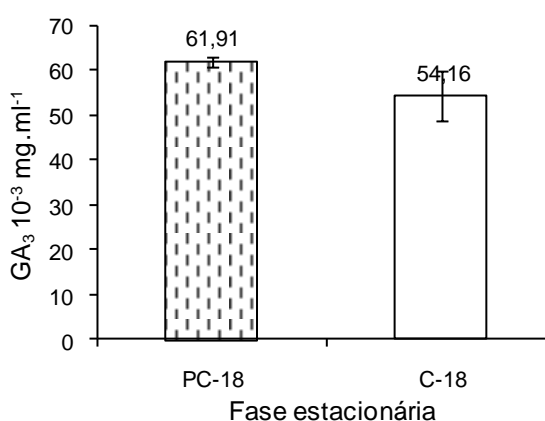
Este experimento, no entanto, ainda não se mostrou conclusivo, a uma possível indução, na capacidade de metabolização do esteviosídeo pelo fungo no meio de fermentação, quando o inóculo é produzido em um meio sem glucose e com esteviosídeo como única fonte de carbono. Isto porque, às condições C e D que mostrariam esta indutibilidade não tiveram produção de GA<sub>3</sub> capaz de serem quantificadas, o que justifica a realização de outras investigações.

#### 4.1.3 Preparação de Amostras com Giberelinas Utilizando Sílica C-18 e PC-18

Este ensaio visou comparar a eficiência da Polimetiloctilsiloxane (PC-18) e a sílica C-18, como fase estacionária para limpeza de amostras, na análise de giberelinas. A PC-18 é uma fase estacionária preparada pela imobilização do polímero metilsiloxane, sobre um suporte de sílica comum com o objetivo de melhorar a estabilidade desta fase, quando do uso de fases móveis ácidas ou básicas e minimizar interações indesejáveis entre o soluto e a fase estacionária (BOTTOLI *et al.*, 2002, TONHI *et al.*, 2002).

A limpeza das amostras para análise de giberelinas e de esteviol e seus glicosídeos foi feita pela técnica de extração em fase sólida (EFS) com sílica C-18. A possibilidade de se usar a PC-18, para a quantificação do GA<sub>3</sub> dos extratos das fermentações, exigiu a validação do método, fazendo-se o ensaio de dessorção com este sistema, que ao final foi analisada por CLAE.

A figura 10 indica que o resultado apresentado pelos dois métodos de limpeza e preparação de amostras é levemente alterado, mostrando que a PC-18, é mais eficiente, tendo recuperado 61,91  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GA<sub>3</sub> adsorvido pela coluna durante a sua preparação. Viu-se ainda que o seu desvio padrão é cinco vezes e meio menor do que o apresentado pela C-18, com recuperação de apenas, 54,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GA<sub>3</sub>.



**Figura 10 - Quantificação de GA<sub>3</sub> por CLAE, comparando o preparo de amostras em colunas de adsorção, com fase estacionária em sílica C18 e PC18 (n = 3)**

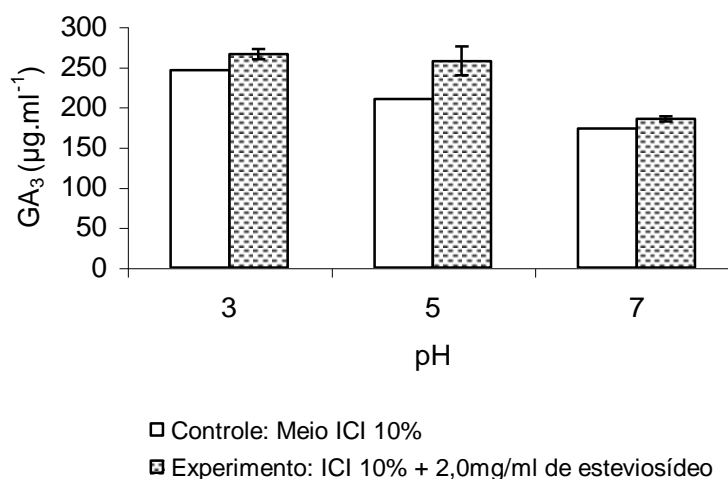
Há uma vantagem no uso da PC-18, que além do seu menor custo quando comparada com a sílica C-18, visto que sua funcionalização é a partir de sílica

comum, apresenta maior seletividade, resultando numa melhor quantificação do GA<sub>3</sub> e ainda apresenta a possibilidade de várias reutilizações. Em função dessas vantagens, a PC-18 passou a ser utilizada na preparação de amostras para quantificação de GA<sub>3</sub>.

#### 4.1.4 Produção de GA<sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo em Diferentes pHs

Visando verificar a influência que diferentes pHs poderiam exercer na produção do GA<sub>3</sub> tendo o esteviosídeo como precursor, realizou-se este experimento. Utilizou-se a *G. fujikuroi* cepas s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, microrganismos que têm se mostrado mais promissores na produção de GA<sub>3</sub>. As condições de fermentação, preparo das amostras e análise do GA<sub>3</sub> foram descritas no item 3.3.12.

Percebe-se claramente na figura 11, que existe uma influência do pH nos resultados, mesmo no controle. A faixa ideal de pH do meio de fermentação para esta cepa s<sub>1</sub> encontra-se entre pH 3,0 e 5,0; onde os valores de GA<sub>3</sub> produzidos estiveram entre 265,9 e 257,7 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



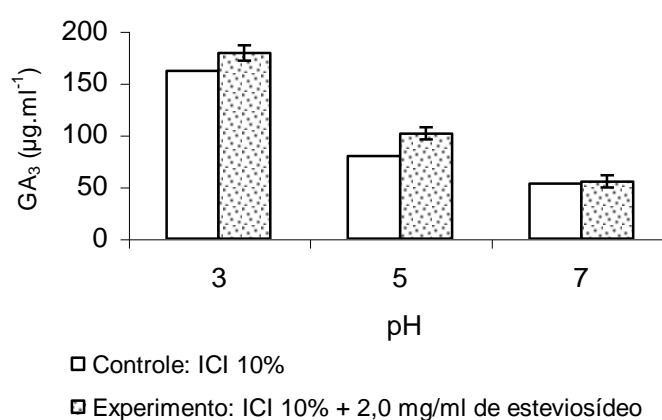
**Figura 11 - Produção de GA<sub>3</sub> pela *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> em diferentes pHs (n = 3)**

Comparando-se ainda os resultados obtidos para as cepas s<sub>1</sub> e a s<sub>2</sub> (Figura 11), observa-se que a melhor produção de GA<sub>3</sub> foi também em pH 3,0 com 179,0 µg mL<sup>-1</sup> ficando ainda muito mais nítida a influência do pH nas condições de biotransformação. Embora os valores alcançados por este microorganismo sejam inferiores aos da cepa s<sub>1</sub> esta evidência, da influência do pH, se mostra de forma



ainda mais contundente. Isto é, que a melhor faixa para a produção de GA<sub>3</sub>, a partir do esteviol está entre pH 3,0 e 5,0.

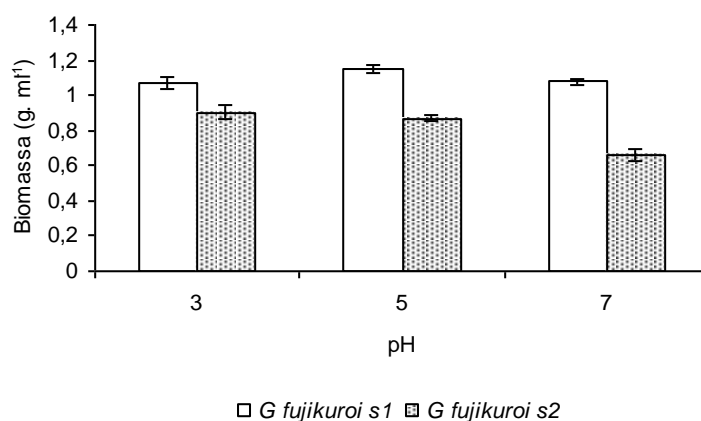
Vários autores (JEFFERYS, 1970, GOHLWAR *et al.*, 1984, BRÜCKNER; BLECHSMIDT, 1991) têm demonstrado que a faixa ótima de pH para a produção de giberelinas está na faixa entre 3,0 e 5,0. Alterações nesta faixa ótima de pH podem alterar a disponibilidade de nitrogênio, fósforo e fontes de carbono afetando decisivamente a biossíntese do GA<sub>3</sub>, além de alterar a labilidade de uma ou mais enzimas da rota biossintética das giberelinas.



**Figura 12 - Produção do GA<sub>3</sub> pela *Gibberella Fujikuroi* s<sub>2</sub> em função do pH (n = 3)**

Outra observação constatada a partir destes resultados é de que a cepa s<sub>1</sub> é a com maior capacidade de produção de GA<sub>3</sub> a partir da biotransformação do esteviosídeo.

A biomassa média, produzida por estas duas cepas, ficou entre 1,10 e 0,89 g mL<sup>-1</sup> durante o período de fermentação (Figura 13), com pequena variação em função do pH. A *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> teve biomassa 26,36% superior a *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, na média dos três ensaios.



**Figura 13 - Biomassa produzida na biotransformação entre a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> em função do pH (n = 3)**

Observou-se nesse experimento, uma correlação entre biomassa e o nível de GA<sub>3</sub> produzido para as duas cepas, onde se mostrou ainda que o pH interferiu nas condições de hidrólise do esteviosídeo. Esta diferença de esteviol disponível no meio de fermentação explica os diferentes rendimentos de GA<sub>3</sub>.

#### 4.1.5 Produção de GA<sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo nos pHs 3,0; 4,0 e 5,0

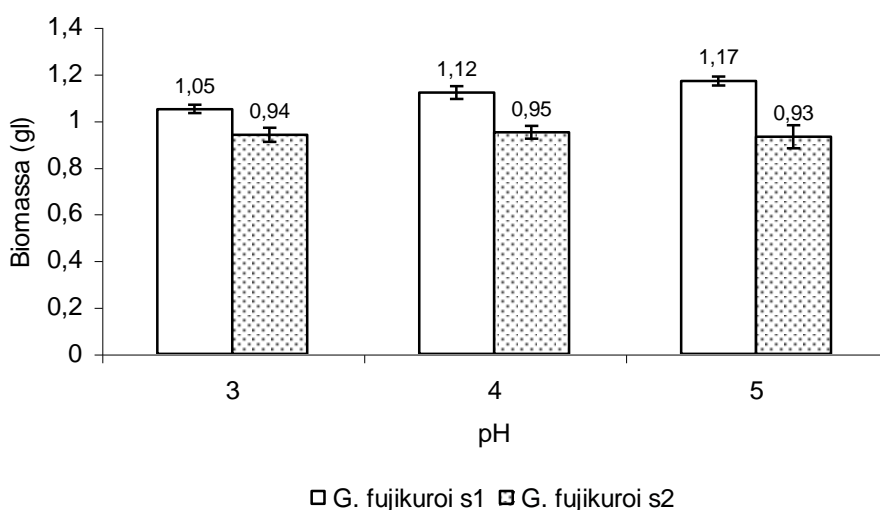
Em função dos resultados anteriores mostrando uma evidente influência do pH na produção de GA<sub>3</sub>, continuou-se então, esta investigação, incluindo o pH 4,0. Na tabela 5, observa-se que as duas cepas de *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> testadas, mostraram comportamentos diferentes para os referidos pHs, tanto na produção do GA<sub>3</sub> em meio ICI 10% normal (Controle), quanto em meio ICI 10%\* com esteviosídeo (experimento).

**Tabela 5 - Produção de GA<sub>3</sub> em relação com a biomassa produzida nos diferentes pHs (n = 3)**

pH	Produção de GA <sub>3</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> )			
	<i>G. fujikuroi</i> s <sub>1</sub>		<i>G. fujikuroi</i> s <sub>2</sub>	
	C	E	C	E
3,0	241,8	313,2	327,7	348,8
4,0	254,1	325,2	182,9	279,3
5,0	289	272,4	161,6	213,0
Média	280,6	303,5	224,1	280,4
C – Controle      E – Experimento				

Os valores de produção de GA<sub>3</sub> deste experimento, apresentam comportamentos distintos para as duas cepas de *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>. Evidenciou-se que, entre pH 3 e 4, a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> teve a melhor produção de GA<sub>3</sub>. Para a cepa *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, a melhor produção de GA<sub>3</sub> foi obtido em pH 3. O rendimento médio de GA<sub>3</sub> nesse pH (348,8 µg mL<sup>-1</sup>) comparado ao controle (327,7 µg mL<sup>-1</sup>) mostrou-se 21% superior, evidenciando que a adição de esteviosídeo ao meio de cultura, nas condições do experimento, traduziram-se em incremento na produção de GA<sub>3</sub>.

A influência do pH no rendimento de GA<sub>3</sub> formado, pode ter ocorrido de várias formas, interferindo nas condições de hidrólise do esteviosídeo. Esta diferença de esteviol disponível no meio de fermentação explica os diferentes rendimentos de GA<sub>3</sub>. A produção de biomassa, embora não tenha apresentado grande variação em função dos diferentes pHs (figura 14), indicou uma habilidade do metabolismo de adaptação fisiológica do fungo frente às adversidades do meio.



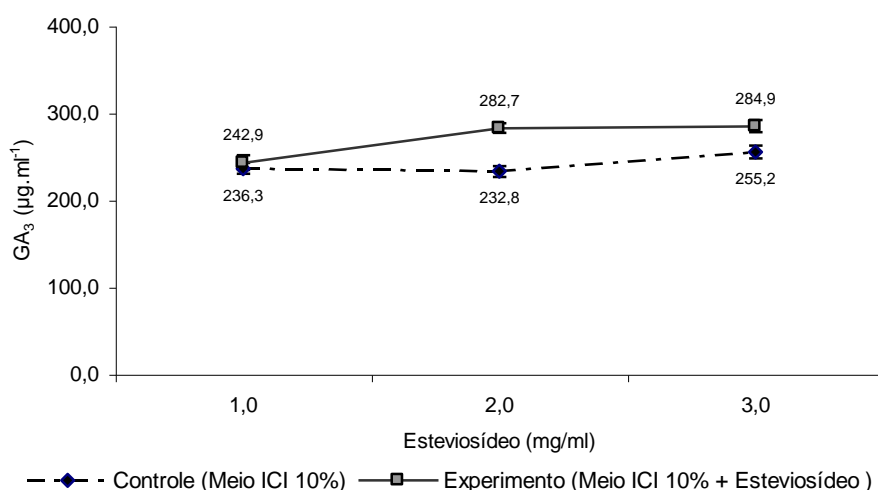
**Figura 14 - Biomassa produzida na fermentação em pH 3,0; 4,0 e 5,0 (n = 3)**

A cepa s<sub>2</sub> teve uma produção de biomassa praticamente inalterada nos diferentes pHs, o que reforça a ideia de que o melhor pH para a biotransformação se dá entre 3,0 e 4,0; provavelmente por condições favorecidas da hidrólise do esteviosídeo, com a formação de esteviol no meio de cultura, já que a biomassa teve pouca variação nos diferentes pHs.

#### 4.1.6 Produção do GA<sub>3</sub> a Partir do Esteviosídeo com a *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub>

Reunindo as informações colhidas em experimentos anteriores, onde as cepas de *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub> foram escolhidas como potencialmente promissoras para a fermentação, bem como a melhor faixa de pH, que foi próximo de pH 4.0. Avançou-se agora, na tentativa de definir em que concentração de esteviosídeo, adicionado ao meio de cultura, poderia resultar em melhor condição de fermentação e consequente produção de GA<sub>3</sub>. Optou-se então pela cepa s<sub>1</sub>, que obteve em avaliação anterior a melhor resposta nesse pH. O inóculo foi produzido a partir de repicagem de cultura reativada em meio *Sabouraud* Modificado, onde parte do micélio foi transferida, para *erlenmeyers* de 250 mL com meio ICI 10%, e deixadas por dois dias em agitação, a 120 rpm na temperatura de 29 °C.

Os resultados (figura 15) mostraram, pouca variação no total de GA<sub>3</sub> produzido, nas diferentes concentrações de esteviosídeo, sendo com 2 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo alcançada a maior diferença de produção de GA<sub>3</sub> entre controle (232,8 µg.mL<sup>-1</sup>) e experimento (282,7 µg.mL<sup>-1</sup>), representando uma diferença de 17,7%.



**Figura 15 - Produção de GA<sub>3</sub> pela *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> em pH 4,0 a partir do esteviosídeo (n = 3)**

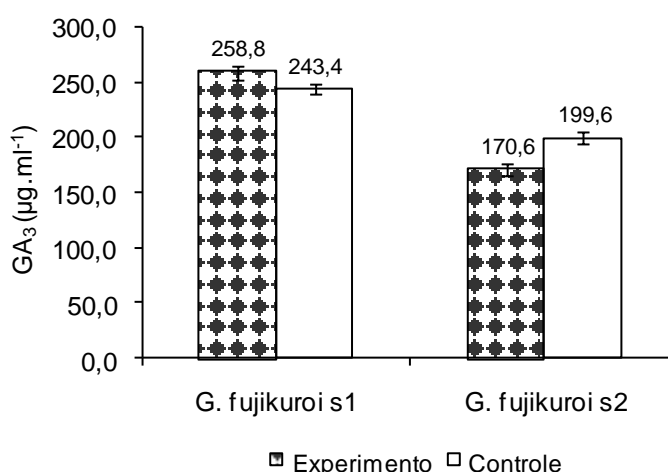
Esta pequena variação na produção de GA<sub>3</sub> ainda não é suficiente para justificar uma concentração de esteviosídeo, que possa ser considerada ótima para futuras fermentações. No entanto a maior resposta em termos de ácido giberélico produzido se deu com a concentração de 3,0 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo, com 284,9 µg.mL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. A biomassa média do experimento (23,4 µg.mL<sup>-1</sup>) foi 10% superior a

do controle ( $21,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando que o desenvolvimento do fungo foi levemente melhorado pela presença de esteviosídeo no meio fermentativo.

A falta de proporcionalidade entre concentração de esteviosídeo e  $\text{GA}_3$  produzido pode ser explicada pelas condições de hidrólise enzimática do esteviosídeo ainda não estarem devidamente otimizadas. Segundo CHIMELI (2003), a retirada das unidades glicosídicas do esteviosídeo depende de uma ou mais enzimas, em etapas sequenciais que atuam nesta etapa da fermentação. Além de pH e temperatura, outros fatores podem estar interferindo nessa hidrólise, como a solubilidade do esteviosídeo no meio de fermentação. Em conjunto esses fatores podem estar impedindo uma resposta de produção de  $\text{GA}_3$  em função das concentrações de esteviosídeo adicionadas.

#### 4.1.7 Influência do Preparo do Inóculo na Produção de $\text{GA}_3$

Sem informações ainda conclusivas a respeito do comportamento do fungo, novas modificações na preparação do inóculo foram planejadas para avaliar a produção de  $\text{GA}_3$  com o inóculo produzido em meio ICI 10% modificado (isento de glucose) + esteviosídeo ( $s_1$ :  $66 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $s_2$ :  $33 \text{ mg.mL}^{-1}$ )- Figura 16.



**Figura 16 - Efeito da composição do inóculo na produção de  $\text{GA}_3$  por fermentação com o esteviosídeo como precursor (n = 3)**

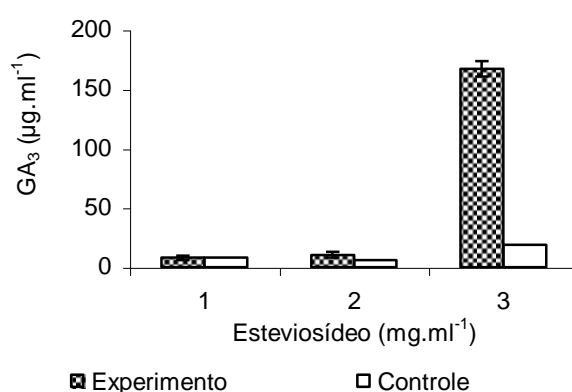
Legenda: *Gibberella fujikuroi*  $s_1$ : inóculo produzido em meio ICI 10% modificado, sem glucose e com  $66,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de esteviosídeo; *Gibberella fujikuroi*  $s_2$ : inóculo produzido em meio ICI 10% modificado, sem glucose e com  $33,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de esteviosídeo; Meio de fermentação para as duas cepas: meio ICI 10% +  $3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  de esteviosídeo.

O objetivo do experimento era verificar a possível indução do sistema enzimático do fungo, melhorando a capacidade de hidrólise do esteviosídeo, já que esta seria a única fonte de carbono disponível no meio de cultura.

A restrição de glucose e adição de esteviosídeo no meio de preparação do inóculo mostraram-se benéficas para a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub>, que apresentou a produção de 258,8 µg.mL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e o controle 243,4 µg.mL<sup>-1</sup>. A *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> não apresentou nenhum incremento na produção de GA<sub>3</sub>, ainda que a concentração de esteviosídeo no meio de preparação do inóculo tenha sido menor. Isto pode ser uma evidência de que a capacidade de hidrólise do esteviosídeo pelas cepas tenha diferentes respostas.

Ainda foram feitas outras tentativas para se melhorar as respostas pelas cepas *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> e s<sub>2</sub>, quando cultivados os inóculos em meios de cultura somente com esteviosídeo.

A figura 17 mostra o experimento realizado com a cepa de *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, obtida de inóculo preparado para o experimento anterior. A alteração com relação ao mesmo experimento é por conta da fermentação realizada em três diferentes concentrações de esteviosídeo, em pH 4,0.



**Figura 17 - Influência do preparo de inóculo e concentrações de esteviosídeo na produção de GA<sub>3</sub> (n = 3)**

Esse resultado mostrando a produção de 167,34 µg mL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, para a concentração de 3 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo evidencia ser um valor adequado a ser adicionado ao meio de fermentação e confirma resultados anteriores (item 4.1.6).

Os valores quantificados de GA<sub>3</sub> neste ensaio, para as concentrações de 1 e 2 mg mL<sup>-1</sup> de esteviol são muito diferentes dos outros com o mesmo fungo e em

condições próximas de fermentação. Houve um problema registrado neste ensaio, com relação à temperatura do agitador orbital, que ultrapassou em alguns momentos os 29 °C, ideal para a fermentação. Isto pode ter causado a isomerização do esteviol, impedindo sua utilização pelo fungo como precursor do GA<sub>3</sub>, dificultando assim uma avaliação mais conclusiva e condições de justificar estes resultados.

#### 4.1.8 Produção de GA<sub>3</sub> com a *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> e s<sub>2</sub><sup>2</sup> em Diferentes Condições de Inóculo e Meio de Produção

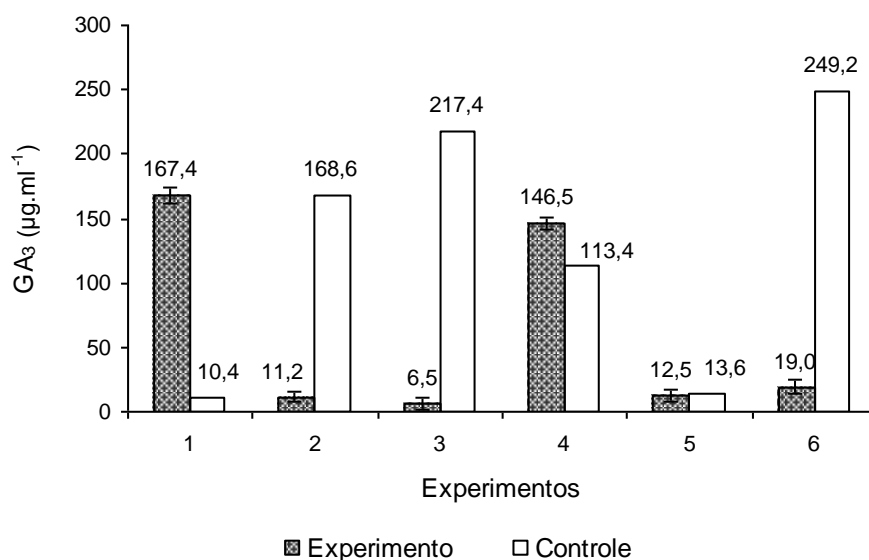
Este experimento descrito no item 3.3.15 de Material e Métodos teve o objetivo de avaliar como várias possibilidades de preparo de inóculo poderiam interferir nas condições de fermentação.

O experimento 1 e 4, com 167,4 µg mL<sup>-1</sup> e 146,5 µg mL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> respectivamente, tiveram respostas de fermentação a partir do esteviosídeo, superiores ao controle (Figura 18).

No primeiro caso, experimento 1, o inóculo nominado de *G. fujikuroi* s<sub>2</sub><sup>2</sup> pode ter alterado a capacidade de hidrólise enzimática deste fungo e quando no meio de cultura em meio ICI 10%, mais 2.0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo apresentou alta produção de GA<sub>3</sub>, quando comparado com o controle. Isso indica que, realmente, existe essa capacidade do fungo, de predispor seu sistema enzimático quando cultivado em um meio sem glucose, melhorando sua capacidade de hidrólise do esteviosídeo em esteviol e potencializar a produção de ácido giberélico.

O experimento 4 apenas confirma experimentos anteriores, onde o inóculo da *G. fujikuroi* s<sub>2</sub>, obtido pela repicagem de micélio, oriundo de meio MSM e levado a meio ICI 10% e posteriormente fermentado em ICI 10% com adição de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo resultou em significativa produção de GA<sub>3</sub>.

Os experimentos 2, 3 e 6, tiveram uma drástica redução na produção de ácido giberélico, ao contrário, os controles apresentaram valores altos (168,6; 217,4 e 249,2 µg.mL<sup>-1</sup>) de GA<sub>3</sub>, respectivamente. Esses resultados mostram a necessidade de outros experimentos, onde as variáveis, preparo de inóculo e parcelamento na adição de esteviosídeo ao meio de fermentação, sejam melhor avaliadas.



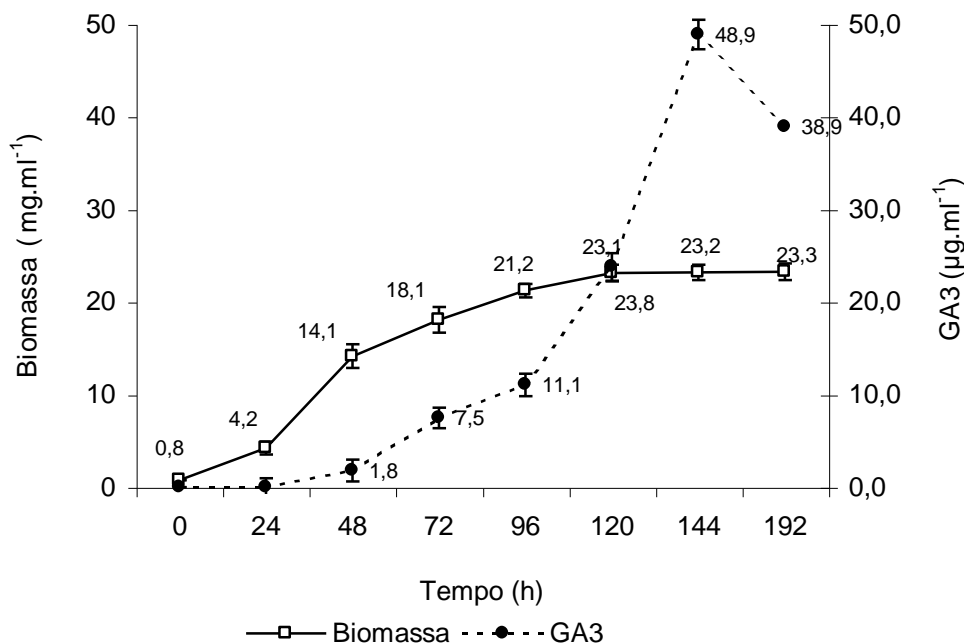
**Figura 18 - Biotransformação do esteviosídeo em várias condições de preparo de inóculo e meio de cultura (n = 3)**

Legenda: **Inóculo** - **I** - *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> de MSC (Meio Sólido Complexo) para ICI 10%; **II** - *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> de MSM (Meio Sabouraud Modificado) para ICI 10%; **III** - *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> de MSM + 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo para ICI 10%; **IV** - *G. fujikuroi* s<sub>2</sub> para ICI 10% (s<sub>2</sub> obtido por repicagens sucessivas em ICI 10% sem glucose + 30 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo); **Meio** - **A**: ICI 10% (80 mg mL<sup>-1</sup> de glucose) + 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo; **B**: ICI 10%\* com 25% de glucose (20 mg mL<sup>-1</sup>) + 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo; **C**: ICI 10%\* com 50% de glucose (40 mg mL<sup>-1</sup>) + 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo; **Experimento** - **1** (IV – A); **2** (I – A); **3** (III – A); **4** (II – A); **5** (II – B); **6** (II – C); **Controle** - **1** (IV); **2** (I); **3** (III); **4** (II); **5** (II); **6** (II); todos em ICI 10%

#### 4.1.9 Cinética da Produção do GA<sub>3</sub> com a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub> em pH 5,0 e Adição de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> de Esteviosídeo

Com o objetivo de compreender o mecanismo de formação da biomassa e a taxa de produção de ácido giberélico ao longo da biotransformação, montou-se este experimento descrito em 3.3.16. O objetivo foi avaliar a formação da biomassa e produção de GA<sub>3</sub> por CLAE a partir do tempo zero, o momento da inoculação, até o final da fermentação, totalizando 192 h.





**Figura 19 - Cinética da produção do GA<sub>3</sub> e biomassa formadas a partir do esteviosídeo (n = 3)**

Legenda: Experimento utilizando a *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub>, em meio ICI 10% com adição de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo e pH do meio de fermentação = 5,0

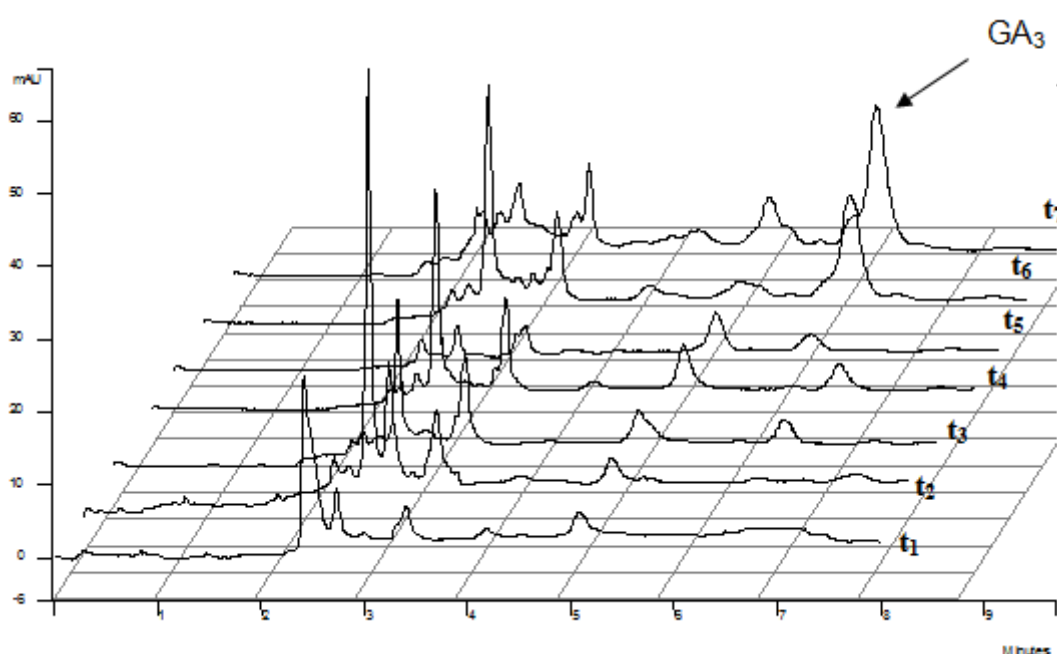
Na figura 19, a quantificação do GA<sub>3</sub> e da biomassa formada evidencia uma correlação entre elas, indicando que no tempo de 144 h de biotransformação, foi atingido tanto o pico de biomassa formada, quanto de GA<sub>3</sub> formado. A partir deste tempo, o GA<sub>3</sub> passa a ser metabolizado pelo microorganismo, já que as fontes de nitrogênio e carbono, iniciais, colocadas no meio de cultura, foram consumidas ao longo da fermentação.

Se forem consideradas as taxas de incremento de biomassa, o intervalo entre vinte e quatro e setenta e duas horas pode ser designado como a fase exponencial de crescimento do microorganismo e deste tempo em diante, até cento e vinte horas, como fase de desaceleração. A partir deste tempo até o final das 192 h de fermentação como fase estacionária, observa-se que 52,8% de todo GA<sub>3</sub>, foi formado nesta fase (23,1 a 48,9 µg.mL<sup>-1</sup>).

A atividade metabólica da fase estacionária foi bem avaliada nas descrições fisiológicas do crescimento do microorganismo e da biossíntese do ácido giberélico pela *Gibberella fujikuroi*, como o instante em que se dá a produção dos chamados metabólitos secundários (BORROW *et al.*, 1964).

O resultado obtido nessa cinética está de acordo com dados de outros trabalhos (SARAVANAN; GOVINDARAJAN, 2000; CANDAU *et al.*, 1992; BRÜCKNER; BLECHSCHMIDT, 1991), indicando que ao cessar o crescimento do fungo e exaustão de fontes de nitrogênio, acentua-se a produção do GA<sub>3</sub> e demais metabólitos secundários.

Na figura 20, pode ser encontrado o cromatograma com os picos de GA<sub>3</sub> formados, nos tempos analisados na fermentação, evidenciando os picos do GA<sub>3</sub> formado, a partir do tempo de 72 h, que corresponde ao final do crescimento exponencial e início da fase de desaceleração do crescimento microbiano.



**Figura 20 - Cromatograma da cinética da biotransformação do esteviosídeo com produção de GA<sub>3</sub> (n = 3)**

Legenda: t<sub>1</sub> = 1 h; t<sub>2</sub> = 24 h; t<sub>3</sub> = 48 h; t<sub>4</sub> = 72 h; t<sub>5</sub> = 96 h; t<sub>6</sub> = 120 h; t<sub>7</sub> = 144 h; Experimento utilizando a *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub>, em meio ICI 10% com adição de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> de esteviosídeo e pH do meio de fermentação = 5,0

## 4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL PARA A PRODUÇÃO 7 $\beta$ -HIDROXIESTEVIOL

### 4.2.1 Obtenção do Esteviol

Visando obter quantidades de esteviol para novas biotransformações a partir dele e não mais do esteviosídeo, partiu-se para a sua obtenção via química, por hidrólise com o periodato de sódio, de acordo com o item 3.4.1. O esteviol obtido, 4,8 g representou um rendimento de 47,9% do esteviosídeo, no início da reação, foi caracterizado por CCD, através de comparação com o padrão, e por RMN.

A hidrólise enzimática não foi utilizada, entre outras razões pela morosidade da hidrólise, que pode ser atribuída em parte, ao grau de solubilidade do esteviosídeo no meio e ainda à especificidade da enzima ou conjunto de enzimas necessárias. Além do que, boa parte do esteviol produzido, já é metabolizado, iniciando-se assim sua conversão em giberelinas. Somam-se ainda, as dificuldades no processo de separação e isolamento do esteviol a partir do meio de fermentação. A hidrólise química ao contrário é bastante rápida e com poucas dificuldades na separação do esteviol produzido.

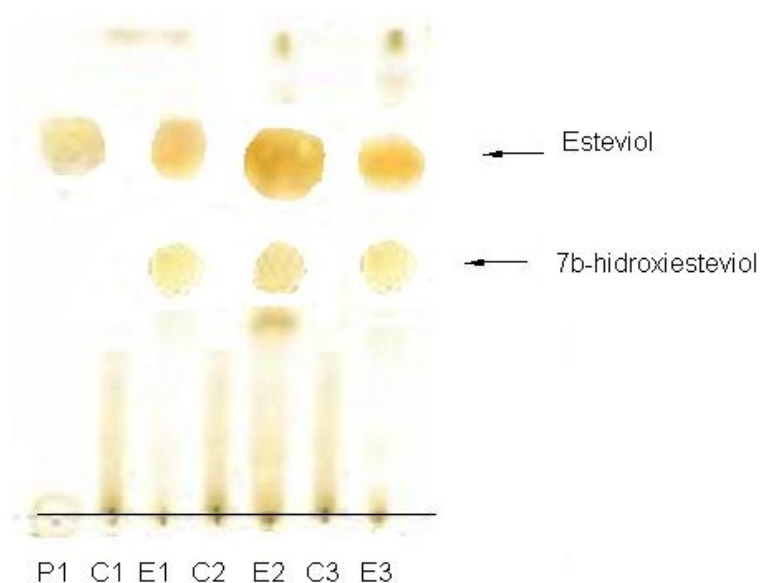
### 4.2.2 Produção do 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol Através de Biotransformação

Para se comprovar sua estrutura química, bem como realizar os ensaios biológicos, avaliar seu potencial fitohormonal, quando comparado com o GA<sub>3</sub> ou com o próprio esteviol, era necessário produzir maior quantidade do composto 7 $\beta$ -hidroxiesteviol. Elaborou-se então este experimento, conforme descrito no item 3.4.2. Em escala preparativa, três frascos de 1000 mL com 250 mL de meio ICI 10%, foram inoculados com o fungo *Gibberella fujikuroi* s<sub>1</sub>, mantidos por quarenta e oito horas na presença de 500 mg L<sup>-1</sup> de esteviol (375 mg de esteviol distribuídos em três frascos) e em pH 4,5.

Após este período de tempo o experimento foi interrompido, procedendo-se à filtração á vácuo. O filtrado, depois de extraído com acetato de etila, foi submetido à análise qualitativa, por CCD com fase móvel hexano: acetato de etila, 1:1,

observando-se o surgimento de mancha não presente no controle, um metabólito formado de Razão de Frente (Rf) inferior ao esteviol (Figura 21).

Os extratos secos obtidos da biotransformação do esteviol visando a obtenção do 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol, depois de analisados por CCD, foram reunidos e dissolvidos, no menor volume possível de metanol. A amostra obtida foi fracionada em Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga utilizando Chromatotron, conforme item 3.4.3.

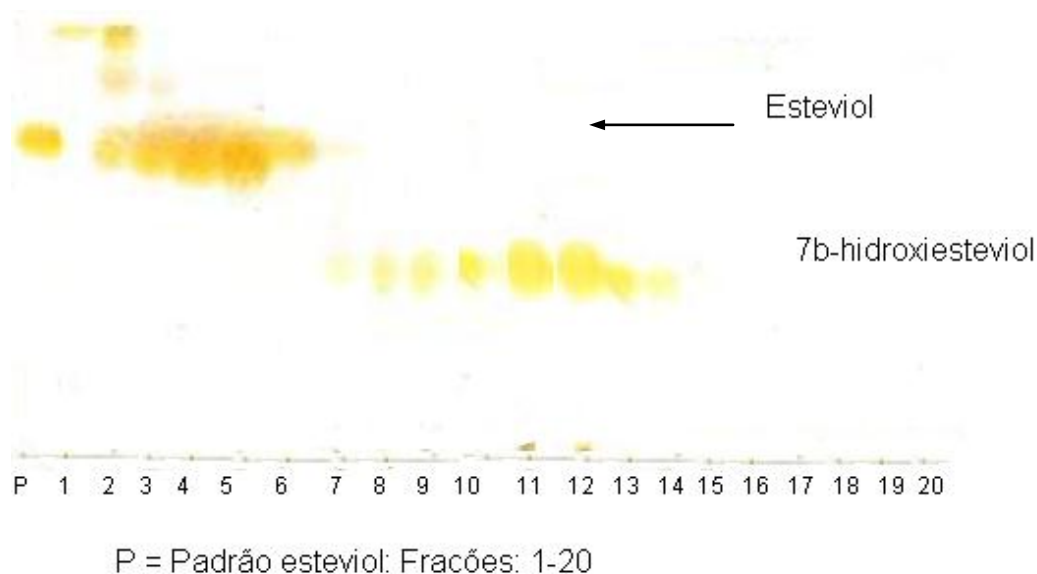


P1 = Padrão Esteviol C1, C2 e C3 = Controles E1, E2 e E3 = Experimentos

**Figura 21 - Análise qualitativa em CCD do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol obtido por biotransformação do esteviol (n = 1)**

#### 4.2.3 Isolamento, Purificação e Comprovação da Estrutura do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol

Após coletadas as frações foram analisadas por CCD (Figura 22) tendo-se logo em seguida, reunido às frações semelhantes.

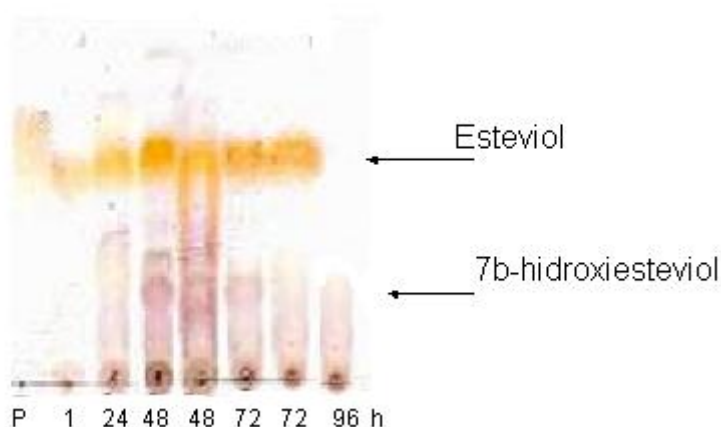


**Figura 22 - Isolamento do 7β-hidroxiesteviol por cromatografia em camada delgada centrífuga**

O esteviol recuperado corresponde ao que não foi metabolizado pelo fungo neste tempo de 48 h de biotransformação, correspondendo às frações de dois a seis. Dos 375 mg de esteviol utilizados (item 4.2.2), foram recuperados 225 mg. As frações entre oito e quatorze foram reunidas, o solvente foi evaporado e o 80 mg do produto foi então purificado por recristalização com metanol. Uma fração foi esterificada com diazometano etéreo e teve sua estrutura determinada por RMN.

Este composto foi obtido também através de biotransformação do esteviol pelos fungos *Rhizopus stolonifer* e *Gibberella fujikuroi* (HANSON; OLIVEIRA, 1990).

Realizou-se ainda em continuidade, outro experimento com o objetivo de avaliar a formação do 7β-hidroxiesteviol, biotransformado a partir do esteviol. O experimento foi realizado em triplicata, com a *G. fujikuroi* s<sub>1</sub>, em frascos de 250 mL com 50 mL de Meio ICI 10%, contendo o 500 mg mL<sup>-1</sup> de esteviol e colocados em biotransformação, foram sacados do agitador orbital, em intervalos de tempo entre 24; 48; 72, 96 e 120 h, preparando-se os extratos, conforme procedimento já descrito e em seguida, analisados em CCD (figura 23).

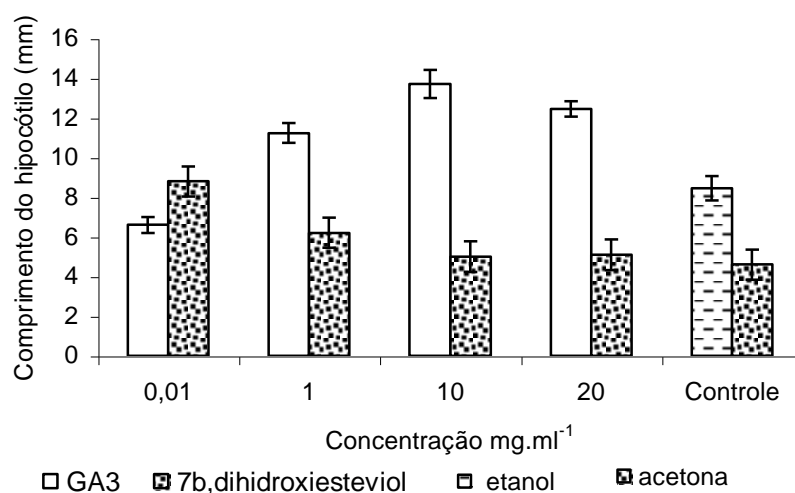


**Figura 23 - Formação do composto 7 $\beta$ -hidroxiesteviol por biotransformação do esteviol em função do tempo de incubação**

Observou-se no início da biotransformação (tempo: 1 h), somente a presença do esteviol. Com 24 horas, já se verifica a presença de outros compostos mais polares, sendo que com 48 horas, realmente evidencia-se a maior formação do composto em estudo, momento em que se deve interromper a biotransformação, visando a obtenção do composto para os testes biológicos. A partir de 72 h, pode-se presumir, que houve o consumo deste metabólito formado, dando sequência à rota metabólica para a formação dos compostos subsequentes, até o ácido giberélico.

#### 4.2.4 Bioensaio Comparando o Efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol Frente ao GA<sub>3</sub>

Com o 7 $\beta$ ,hidroxiesteviol, devidamente isolado e com estrutura química caracterizada, partiu-se então para a avaliação do seu comportamento como fitohormônio, através do bioensaio com sementes de alface, conforme descrito, no item 3.4.6 A figura 24, mostra o efeito ativador no desenvolvimento do hipocótilo desempenhado pelo GA<sub>3</sub> e o 7 $\beta$ -hidroxiesteviol.



**Figura 24 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7β-hidroxiesteviol nas concentrações de 0,01 a 20 mg mL<sup>-1</sup> frente ao padrão GA<sub>3</sub> (n =3)**

Legenda: Controle - etanol = GA<sub>3</sub>; acetona = 7β,hidroxiesteviol

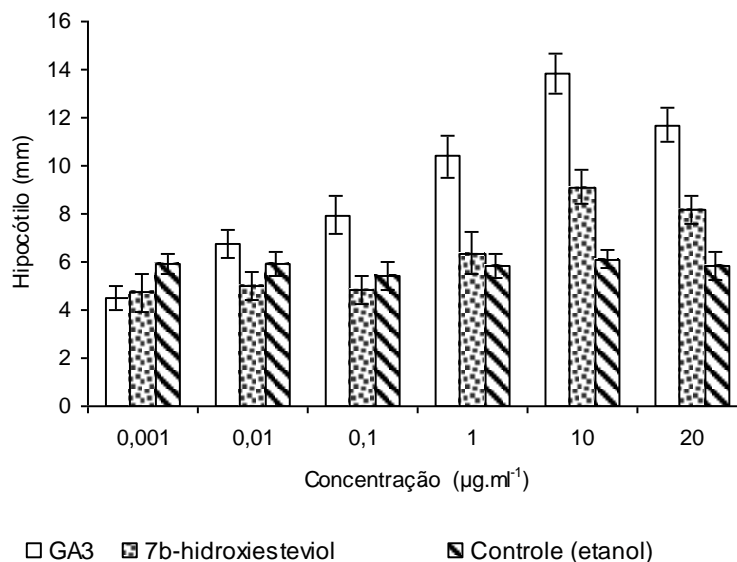
Observou-se que o fitohormônio padrão, o GA<sub>3</sub> teve um desempenho muito superior ao 7β-hidroxiesteviol, em três diferentes concentrações: 1,0; 10,0 e 20,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Somente na concentração de 10<sup>-2</sup> µg.mL<sup>-1</sup>, o composto analisado superou o fitohormônio padrão.

Outro fato a ser observado, foi com relação ao comportamento do GA<sub>3</sub>; na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup> verificou-se o melhor crescimento do hipocótilo. Ao contrário, na concentração de 20 µg.mL<sup>-1</sup>, notou-se uma pequena redução, mostrando assim uma certa “inibição”, desta concentração, em uma sua ação fitohormonal.

Fica, porém uma questão a ser dirimida: entender a possível influência que o etanol como solvente do 7β-hidroxiesteviol possa ter exercido, nas maiores concentrações do ensaio. Já que às concentrações de etanol em cada ensaio, foram decrescentes, partindo de 20 até 10<sup>-2</sup> µL mL<sup>-1</sup> e o controle foi realizado somente na concentração 1 µL.mL<sup>-1</sup> de etanol. Por outro lado, foi na concentração 10<sup>-2</sup> µg mL<sup>-1</sup> dos compostos avaliados que o composto 7β-hidroxiesteviol, teve seu melhor desempenho, comparado ao GA<sub>3</sub>, coincidindo com a menor proporção de etanol presente na solução teste.

Para elucidar uma possível influência do etanol, inibindo a ação dos compostos testados, procedeu-se novo ensaio, utilizando-o agora, como solvente

dos dois compostos, fazendo triplicatas controle com etanol, para cada concentração avaliada (Figura 25).



**Figura 25 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol frente ao padrão GA<sub>3</sub> (n = 3)**

Verificou-se neste ensaio um comportamento semelhante ao anterior para o GA<sub>3</sub>, confirmando que a melhor resposta do bioensaio se deu na concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com valores próximos de comprimento de hipocótilo. Houve também uma inibição do crescimento, com a concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e se pode desta forma afirmar, que não houve nenhuma ação deletéria ou sinérgica do etanol como solvente do GA<sub>3</sub>.

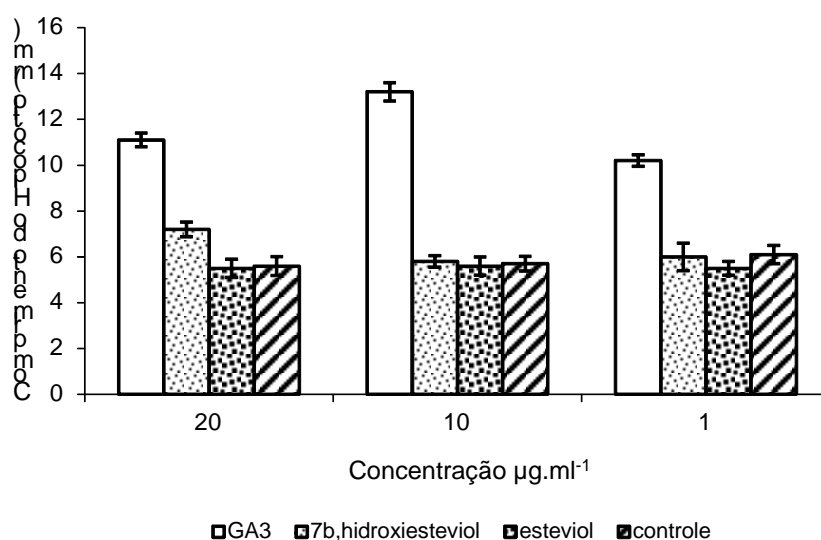
Já com relação ao 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, o comportamento neste ensaio foi contrastante com relação ao anterior, dando um comportamento, análogo ao do GA<sub>3</sub>, porém com menores valores. Isso indica que o composto realmente exerce função fitohormonal nas concentrações de 10; 20 e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , quando comparado ao controle.

Neste ponto, outra questão é colocada, qual seria o comportamento do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, comparado com o esteviol, quando testados mediante um bioensaio, motivando novo experimento.



#### 4.2.5 Bioensaio Comparando o Efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol Frente ao Esteviol

Este experimento apresenta um efeito fitohormonal positivo do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, quando comparado com o esteviol na concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 26). A questão limitante deste ensaio se deve ao pouco desenvolvimento do hipocótilo para todas as concentrações, devida às alterações da temperatura no interior da câmara de fotoperíodo. Isso não invalida, no entanto, o ensaio, dado que as alterações afetaram de forma igual, todas as placas.



**Figura 26 - Bioensaio com o teste do hipocótilo, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, frente o GA<sub>3</sub>, e o esteviol (n = 3)**

Embora não tenha havido um comportamento do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol extremamente diferenciado ao do esteviol, é possível avaliar que sua assimilação pelas células vegetais, venha trazer algum efeito positivo o que e justifica novos ensaios.

Seguindo na avaliação dos efeitos biológicos, foi realizado outro ensaio para o GA<sub>3</sub>, o esteviol e o seu derivado 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, nas concentrações, 10, 20 e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , procurando desta forma, concluir sobre o seu possível efeito fitohormonal.

Observou-se desempenho semelhante do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, quando comparado a ensaios anteriores, sendo a concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aquela em que seu efeito é mais expressivo, e fica clara pela repetição dos ensaios, a alta

eficiência do GA<sub>3</sub>, na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. Confirma ainda, o ensaio, a pouca ação do esteviol em sua atividade promotora da elongação do hipocótilo.

Foram analisados ainda estes compostos, através do bioensaio da aleurona de cevada. Já que este teste mede o teor de α-amilase das camadas de aleurona do grão de cevada e esta atividade, é iniciada pelas giberelinas ou compostos com atividade fitohormonal relevante. Isto torna possível então elucidar de forma complementar a real eficiência dos compostos testados.

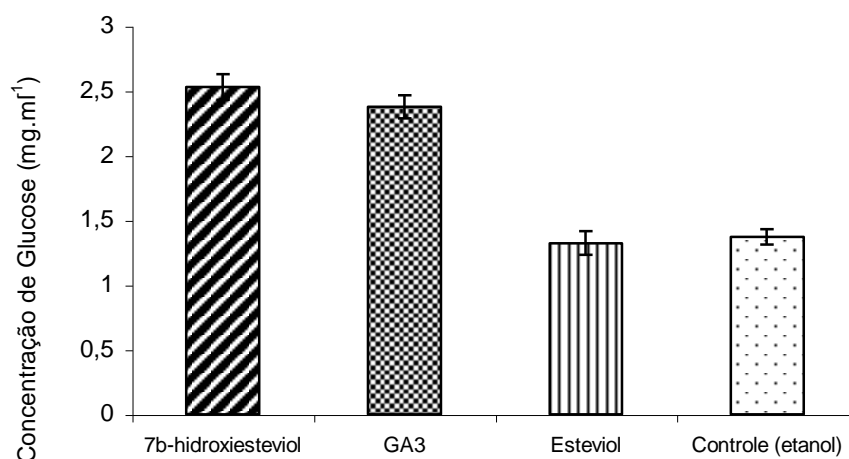
#### 4.2.6 Bioensaio de Aleurona de Cevada

Este teste mede o teor de α-amilase das camadas de aleurona do grão de cevada e a atividade iniciada pelas giberelinas ou compostos com atividade fitohormonal relevante. Isto torna possível então elucidar de forma complementar a real bioatividade dos compostos testados.

Por meio deste ensaio, procurou-se verificar a exata relação de atividade biológica do 7β-hidroxiesteviol, frente ao esteviol e ao GA<sub>3</sub>. O método apresentou maior sensibilidade, dado que os níveis de resposta têm menor variação, dentro de um mesmo ensaio.

O experimento necessitou ser refeito, uma segunda vez, em função do grande desvio padrão. Percebeu-se que as quantidades de metades de grãos degerminados, contados para cada ensaio, não foram suficientes para garantir a devida homogeneidade de massa a ser hidrolisada. Numa segunda tentativa, determinaram-se massas de sementes com diferença entre os ensaios, menores do que 0,01 g.

Assim procedendo, o ensaio foi realizado e os resultados foram plotados na figura 27. Pode-se verificar que o 7β-hidroxiesteviol apresentou melhor nível de resposta que o fitohormônio padrão, enquanto o esteviol não apresentou nenhum efeito fitohormonal, resposta idêntica aos experimentos anteriores, onde se mediu o desenvolvimento do hipocótilo.



**Figura 27 - Teste da aleurona da cevada, comparando o efeito do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, frente o GA<sub>3</sub>, e o esteviol (n = 3)**

Outro fato a ser destacado, se refere a uma dúvida existente, se haveria alguma influência do uso de etanol como solvente do 7 $\beta$ -hidroxiesteviol, quando de sua preparação para o experimento. Por meio dos resultados obtidos, mostrou-se que esta preocupação era irrelevante.

## 5 CONCLUSÃO

- O esteviosídeo é convertido em ácido giberélico pelo fungo fitopatogênico *Gibberella fujikuroi*.
- A composição do inóculo influencia no rendimento da transformação. Na presença de esteviosídeo como única fonte de carbono e após transferência para o meio de produção a *Gibberella fujikuroi* apresenta melhor rendimento. Isto se deve, provavelmente, à indução de hidrolases facilitando a liberação de esteviol no meio de produção e sua consequente conversão em giberelinas.
- O pH ideal para a biotransformação do esteviosídeo em GA<sub>3</sub> é próximo de 4,0. Este é, também, o pH ideal para hidrólise do esteviosídeo.
- A *G. fujikuroi* converte o esteviol em 7β-hidroxiesteviol em 24-48 h de reação.
- O teste do hipocótilo do 7β-hidroxiesteviol mostrou atividade fitohormonal inferior à do ácido giberélico. A melhor resposta ocorreu na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>.
- A ação estimuladora do crescimento vegetal do 7β-hidroxiesteviol foi comparada ainda, com o a do esteviol tendo o GA<sub>3</sub> como padrão. Sendo a concentração de 20 µg.mL<sup>-1</sup> aquela em que seu efeito é mais expressivo. O esteviol não apresentou nenhuma atividade. Isto evidencia que a hidroxilação promovida na biotransformação, representa um ganho em atividade fitohormonal.
- O bioensaio da aleurona da cevada foi onde a atuação do 7β-hidroxiesteviol, teve melhor nível de resposta, superando o fitohormônio padrão. Isso indicou, desta forma, o valor biológico deste composto, que pode ser complementado com testes em escala piloto, como um substituto do GA<sub>3</sub>, com muito mais facilidade de obtenção e muito menor custo. Esta resposta obtida pelo composto nesse teste foi possível em função da alta sensibilidade da aleurona a concentrações de 10<sup>-3</sup> µg de GA<sub>3</sub> ou menos por frasco em teste.
- O esteviol confirmou idêntica resposta aos experimentos anteriores, mostrando que a molécula, não apresenta nenhuma atividade promotora do crescimento vegetal.

## 6 PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS

Pontos relevantes poderão ser ainda estudados, dando continuidade ou respondendo questões ainda não inteiramente claras a partir da investigação iniciada nesse trabalho. Entre eles podem ser ressaltados os seguintes aspectos:

- Estudo da produção do ácido giberélico a partir do esteviosídeo, em fermentadores (escala piloto), monitorando alguns parâmetros da fermentação, como: pH, temperatura e a relação concentração de esteviosídeo/produção de giberelina em função do tempo de fermentação.
- A não proporcionalidade entre concentração de esteviosídeo e GA<sub>3</sub> produzido no meio de fermentação, deve ser melhor investigada. Avaliar as condições de hidrólise enzimática do esteviosídeo e principalmente os fatores podem estar dificultando esta hidrólise.
- Otimizar a produção do 7β-hidroxiesteviol através de aumento de solubilidade do esteviol no meio de cultura (encapsulação).
- Testar o 7β-hidroxiesteviol em processos de maltagem, em escala piloto, em substituição ao ácido giberélico.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T.C.S.; DANTAS, B.F. **Uso de substâncias orgânicas na produção de uvas de mesa**. Disponível em: <[http://www.cpatsa.embrapa.br/sistema\\_producao/spvideira/substancias.htm](http://www.cpatsa.embrapa.br/sistema_producao/spvideira/substancias.htm)> Acesso em 05 out. 2004.

ANDOLFI, L.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M. Bio-agronomic characteristics of *Stevia rebaudiana*. **Informatore-Agrario**, Italy, v. 23, n. 58, p. 48-51. 2002.

ATLAS, R.M. **Principles of microbiology**. 2<sup>nd</sup>. ed., WCB. Mc Graw-Hill, 1996.

BARBOSA, W. **UVAS (Vitis vinifera)**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/centros/centro%20de%20fruticultura/frutiferas/uva.htm>>. Acesso em 05 set. 2004.

BORROW, A.; JEFFERYS, E.G.; NIXON, I.S. **Process for the production of gibberellic acid**. PO. 838.033. I. C.: C12d. 22 jun. 1960.

\_\_\_\_\_; *et al.* Gibberellic acid, a metabolic product of fungus *Gibberella fujikuroi*: some observations on its production and isolation. **Journal of Science and Food Agricultural**, v 6, p. 340-348, 1955.

\_\_\_\_\_; *et al.* Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal Microbiology**. v. 7, p. 227-276, 1961.

\_\_\_\_\_; *et al.* The cinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 407-444, 1964.

BOTELHO, R. V. Efeitos do thidiazuron e do ácido giberélico nas características dos cachos e bagas de uvas 'niagara rosada' na região de Jundiaí-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, 2002.

BOTTOLI *et al.* Poly (alkmethylsiloxanes) thermally immobilize on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 948, p. 121-128, 2002.

BRÜCKNER, B.; BLECHSMIDT, D. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 646-650, 1991.

BRIGGS, D. E. **Malts and malting**. 1.ed. Culinary and Hospitality Industry Publications Services. p. 796. 1998.

CARL, L. P.; KRIEDMANN, P.E. **Plant Growth and Development**. 2.<sup>nd</sup> ed., Mc Graw-Hill, Book Company, 1975.

CASTELLARO, J.S.; *et al.* Stereochemistry of the metabolic steps from kaurenoic acids to kaurenolides and gibberellins. **Phytochemistry**, v. 29. n. 6. p. 1833-1839, 1990.

CANDAU, R.; AVALOS, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Plant Physiology**, 100, p. 1184-1118, 1992.

CASTILLO, G.; MARTINEZ, S. Reversed-phase C<sub>18</sub> high-performance liquid chromatography of gibberellins GA<sub>3</sub> and GA<sub>1</sub>. **Journal of Chromatography A**, n. 782, p. 137-139, 1997.

\_\_\_\_\_; *et al.* Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in agitador orbital flasks and bioreactor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 753-765, 1999.

CATO, S.C. **Efeito do Anelamento e de doses do ácido giberélico na frutificação das uvas “Niágara Rosada” e “Vênus” nas regiões Noroeste da Alta Paulista e estado de São Paulo**. Piracicaba, 2002. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CHIMELLI, M. **Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicosilação**. 161 f. Tese (Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

CHRISTOD, A.J.; WEAVER, R.J.; POOL, R.M. Relation of gibberellin treatment to fruit-set berry development and cluster compactness in vitis vinifera grapes. **Paper American Society of Horticulture and Science**, v. 92, p. 301-309, jun. 1968.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnologia: manual de microbiologia industrial**. 3. ed. Zaragoza (ESP): Acríbia, 1993.

ESCAMILLA SILVA, E.M.; *et al.* Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in orbital flasks and bioreactor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 753-755, 1999.

GARCIA-MARTINEZ, J.L.; GIL, J. Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 3, n. 12, p. 245-258, mar. 2002.

FERNANDES-MARTINS, R.E.; *et al.* Ent-Kaurene and squalene synthesis in *Fusarium fujikuroi* cell-free extracts. **Phytochemistry**, England, v. 54, p. 723-728, 2000.

FERREIRA, G.; ERIG. P.R.; MORO, E. Produção do porta-enxerto (*Annona squamosa* L.) com o uso de reguladores vegetais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, dez. 2002.

FIDELIBUS, M.W.; TEIXEIRA, A.A.; DAVIES, F.S. Mechanical properties of orange peel and fruit treated pre-harvest with gibberellic acid. **Transaction of the Asae**, v. 45, n. 4, p. 1057-1062, jul-ago. 2002.

GOHLWAR, C.S., *et al.* Gibberellic acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. **Enzyme-Microbiology and Technology**, v. 6, n. 7, p. 312-316, 1984.

GRAEB, J.E. Gibberellin biosynthesis and control. **Annual Review Plant Physiology**, v. 38, p. 419-465, 1987.

HANSON, J.R.; OLIVEIRA, B.H. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. **Natural Products Reports**, p. 301-309, 1993.

HEDDEN, P., *et al.* Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 4, n. 11, p. 1205-1218, mar. 2002.

HUDSON, J.L. **Gibberellic Acid**: kits and supplies. Disponível em: <<http://www.jlhudsonseeds.com/GibberellicAcid.htm>> Acesso em: 06 set. 2004.



HOLLMANN, D.; *et al.* Extractive fermentation of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 6, p. 594-600, 1995.

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES. BRIAN, P. W. *et al.* **Gibberellic acid and derivatives thereof**. Int. C05c, d, f. C07g. C12d. N. 783,611 The Patent Office, London. Dec. p.01-10, 1957.

IORE, A. Empresa do Paraná tenta vender estêvia para os EUA. **Gazeta do Povo**, Curitiba, 30 set. 2004. Economia Rural, p. 25.

JEFERYS, E.G. The gibberellin fermentation. **Advances Applied Microbiology**, v. 13, p. 283-316, 1970.

JONES, A.; PHARIS, R.P. Production of gibberellins and bikaverin by cell of *Gibberella fujikuroi* immobilized in carrageenan. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 65, n. 6, p. 717-722, 1987.

JONES, R.R.; VARNER, J.E. The bioassay of gibberellins. **Planta**, v. 72. p. 155-161, 1967.

KAHLON, S.S.; MALHOTRA, S. Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 613-616, out. 1986.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1197-1210. 1997.

KIM, K.K.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to stevio in *Stevia rebaudiana bertini* – purification and partial characterization of the enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 332, n. 2, p. 223-230, 1996.

KLIBANSKY-DELGADO, M; GONZALES-PENICHET, L. Current use of biofertilizers in Cuba. **Revista ISIACA** - sobre los derivados de la cana-de-azucar. special, n. 30, p. 54-71. 1996.

KUMAR , P.K.R.; LONSANE, B.K. Immobilized growing cells of *Gibberella fujikuroi* P-3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnonology**, v. 28, p. 537-542. 1988.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Microbial production of gibberellins: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 29-139, 1989.

LEÃO, P.C.S. **Thompson seedless**: potencial para cultivo no Vale Do São Francisco. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br/noticias/noticia46.htm.htm>> Acesso em 12 set. 2004.

Mac MILLAN, J. Analysis of Plant Hormones and Metabolism of Gibberellins: Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. **Society for Experimental Biology Seminar**. Cambridge University Press, v. 23, p.1-16, 1984.

\_\_\_\_\_. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. **Natural Products Reports: a Journal of Current Developments in Bio-Organic Chemistry**, v.14, p. 221-243, 1997.

MEAINHARDT, F.; ESSER, K. Filamentos Fungi. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: Biological Fundamental Aspects**. New York: VCH Publishers, 1993. p. 516-542.

MERTZ, D. Light-stimulated incorporation of l-leucine into the gibberellin of *Gibberella fujikuroi*. **Plant & Cell Physiology**, v. 11, p. 273-279, 1970.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MODESTO, J.C.; RODRIGUES, J.D.; PINHO, S.Z. Ácido giberélico e o desenvolvimento de plântulas de tangerina “Cleópatra” (*Citrus reshni hort.* Ex. Tanaka). **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, p. 289-294, 1999.

\_\_\_\_\_; *et al.* Influência da aplicação pré-colheita de ácido giberélico em tangerineira “PONKAN”. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, supl., p. 51, 1999.

MOROFUSHI, N.; *et al.* Metabolism of steviol and its derivatives by *Giberella fujikuroi*. **Agriculture Biology and Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 2305-2311, 1982.

NEPRON- UEM (NÚCLEO DE ESTUDOS DE PRODUTOS NATURAIS – Universidade Estadual de Maringá). **Projeto de pesquisa "Estudos Biotecnológicos de *Stevia rebaudiana* Bert Bertoni**. Disponível em: <<http://www.dbq.uem.br/index-nepron.html>> Acesso em: 09 set. 2004.

OGAWA, T.; NOZAKI, M.; MATSUI, M. Total synthesis of stevioside. **Tetrahedron**, v. 36, p. 2641-2648. 1980.

PEARCE, D.W.; KOSHIOKA, M.; PHARIS, R. Chromatography of Gibberellins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 658, p. 91-122, 1994.

PENSACK, J.M.; CHORNOCK, F.W. **Improvements in nor relating to Animal Feed Supplements**. Int. A23k n. 860,765. Feb. 8, 1961.

PEREZ, F.J.E.; GOMEZ, M. Gibberellic acid stimulation of isoperoxidase from pedicel of grape. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3. p. 411- 414, 1998.

PÉREZ-CORREA, C.G.R.; AGOSIN, M.G.E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227–1233, 2000.

PIMENTEL, I.C. **Fungos Endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine Max* (L.) Merril) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas**. 154 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

PROKOP, A. Challenges in Commercial Biotechnology. Part I. Product, Process, and Market Discovery. In: NEIDLEMAN, S.; LASKIN, A. I. **Applied Microbiology**, California: Academic Press, p. 95-152, 1995.

REEVE, D.; CROZIER, A. Gibberellin bioassays. In: KRISHN, H. N. **Gibberellins and Plant Growth**. New Delhi: John Wiley & Sons, 1975. p. 35-64.

ROSS, J.J.; *et al.* Auxin-Gibberellin interactions and their role in plant growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 4, p. 185-195, 2002.

SATO, C.T. **Produção Microbiológica de Giberelinas em escala laboratorial**. 1994. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 1994.

SARAVANAN, P. M.; GOVINDARAJAN, K. Gibberellic acid production by fungi. **Madras Agricultural Journal**, v. 86, n. 7-9, p. 373-374, 2000.

SHIBATA, H.; *et al.* Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *stevia rebaudiana bertonii* – purification and partial characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 321, n. 2, p. 390-396, 1995.

SKUTNIK, E.; *et al.* Effect of growth regulators on post harvest characteristics of *Zantedeschia aethiopica*. **Post harvest Biology and Technology**, n. 21. p. 241-246, 2000.

SMITH, M.; BRIGGS, D.E. Externally applied gibberellic acid and  $\alpha$ -amylase formation in grains of barley (*Hordeum distichon*). **Phytochemistry**, England, v. 19. p. 1025-1033, 1979.

SOCIETE D'ETUDES ET D'APPLICATIONS BIOCHIMIQUES. Jouy-en Josas. **Process for extracting fermentation liquids**. Int. C12d. Fr., 936.548. 11. set. 1963.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**. 1 ed. Oxford: Pergamon Press, 1984.

STODOLA, E.; *et al.* The microbiological production of gibberellins A and X. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 54, p. 240-245, 1955.

SURULIRAJAN, M.; SARBHOY, A.K. Gibberellic acid production by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Mycopathological Research**, v. 38, n.2, p. 101-104, 2000.

TERRA, M.M. Nutrição, calagem e adubação. In: **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. 1.ed. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 405-476, 2003.

TACHIBANA, S.; UEMURA, S.; SUMIMOTO, M. The utilizations of forest resources by microbial, enzymatic, and chemical conversions III. Microbial conversion of (-) kaurene and its derivatives to gibberellins. Mokuzai-Gakkaishi, **Journal of JapanWood Research Society**, v. 35, n. 8, p. 761-770, 1989.

TONHI, E.; COLLINS, K.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly (methyloctylsiloxane) immobilized on silica. II Chromatographic evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 948, p. 109-119, 2002.

TUDZINKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 298-310, 1999.

WALSH, C. Overview: biocatalysis. enabling the chemistry of life. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 226-231, jan. 2001.

WANG, Y.Z.; ZANG, D.P. Activities, quantitative changes and subcellular localization of alpha-amylase during development of apple fruit. **Acta Botanica Sinica**, v. 44, n. 1, p. 34-41, jan. 2002.

VOGEL, A. **Textbook of practical organic chemistry**, 5<sup>th</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.